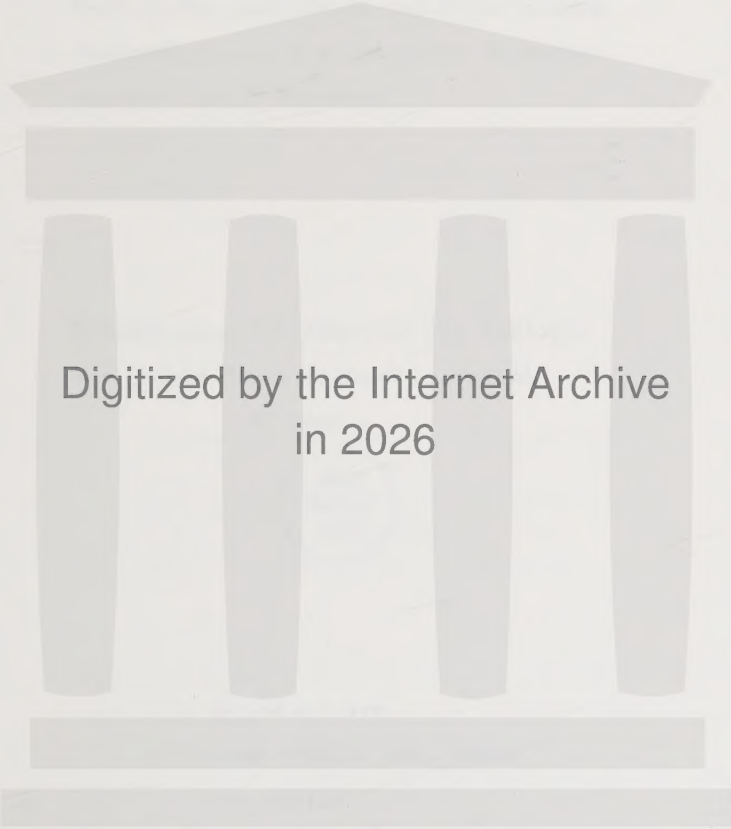


**Glukose – Katabolitrepression bei
Saccharomyces cerevisiae:
Isolierung, genetische und biochemische Charakterisierung
konstitutiv dereprimierter (ccr^-) Mutanten**

Elfriede Schmitt

1980



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549007_0006

Glukose - Katabolitrepression bei

Saccharomyces cerevisiae :

Isolierung, genetische und biochemische

Charakterisierung konstitutiv derepri-

mierter (ccr^-) Mutanten

Dissertation der Fakultät für Biologie

der Ludwig-Maximilians-Universität

München



vorgelegt von

Elfriede Schmitt geb. Böker

aus Berlin

Dezember 1979



1. Berichterstatter : Priv. Doz. Dr. R.J.Schweyen

2. Berichterstatter : Priv. Doz. Dr. W.Bandlow

Tag der mündlichen Prüfung : 10. März 1980

INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG	1 - 5
MATERIAL UND METHODEN	6 - 21
1. Stämme	6
2. Genetische Symbole	6
3. Medien	7
4. Pufferlösungen	8
5. Feinchemikalien	9
6. Methoden	10 - 21
6.1. Zellkulturen und Wachstumskurven	10
6.2. TTC-Overlay-Agar-Methode	10
6.3. Isolierung konstitutiv dereprimierter Mutanten	11
6.4. Kreuzungen und Tetradenanalyse	12
6.5. Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs und der CO ₂ -Produktion	13
6.6. Anwendung der DAPI-Fluoreszenzmethode nach Williamson und Fennell	15
6.7. Tieftemperatur-Spektroskopie an ganzen Zellen	16
6.8. Bestimmungsmethoden	16
6.9. Einbau radioaktiv markierter Aminosäuren in ganze Zellen	17
6.10. Radioaktive Markierung der Hefe-DNS	18
6.11. Kontrollen und Bestimmung der rho ⁻ Bildung	20
7. Abkürzungen	20
ERGEBNISSE	22 - 74
I. Isolierung konstitutiv dereprimierter Mutanten	22
1. Charakterisierung eines optimal Glukose-Katabolit-reprimierten Stammes der Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	22

2.	Isolierung konstitutiv dereprimierter Mutanten	24
II.	Genetische Charakterisierung konstitutiv dereprimierter Mutanten	26
1.	Bestimmung des Vererbungsmodus der ccr^- Mutanten	26
2.	Rekombinationsanalyse	29
3.	Bestimmung der ρ^- Rate	30
III.	Biochemische Charakterisierung der konstitutiv dereprimierten Mutanten	31
1.	Wachstumscharakteristika	32
2.	Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs und der CO_2 -Produktion	32
2.1.	Sauerstoffverbrauch bei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen der Hefezellen	32
2.2.	CO_2 -Produktion während der Glukoserepression	40
3.	Wachstum und Sauerstoffverbrauch der Hefezellen nach Zugabe von D-Glucosamin zum Wachstumsmedium	43
3.1.	Wachstum der ccr^- Mutanten und des Wildtyps in Glyzerinmedium mit D-Glucosamin	43
3.2.	Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs während des Wachstums der Hefezellen in D-Glucosamin-Medium	45
4.	Anwendung der DAPI-Fluoreszenzmethode zur Bestimmung der Anzahl fluoreszierender, cytoplasmatischer Strukturen in der Hefezelle	47
5.	Tiefemperatur-Spektroskopie an ganzen Zellen	50
6.	Wirkung der Katabolitrepression auf cytoplasmatische und mitochondriale Enzymaktivitäten	55
7.	Wirkung der Glukose-Repression auf den Einbau von markierten Aminosäuren in mitochondriale Proteine	58
7.1.	Nachweis mitochondrialer Proteinsynthese	58
7.2.	Veränderungen der mitochondrialen Proteinsynthese während der Repression	58

8.	Radioaktive Markierung der DNS beim Wildtyp und bei den ccr^- Mutanten	65
8.1.	Isolierung und Bestimmung der <u>mit</u> DNS	65
8.2.	Veränderungen des prozentualen Anteils der <u>mit</u> DNS während der Katabolitrepres- sion	68
DISKUSSION		74 - 86
ZUSAMMENFASSUNG		86 - 89
LITERATURVERZEICHNIS		90 - 95

E I N L E I T U N G

Der Begriff "C a t a b o l i t e R e p r e s s i o n" wurde von Magasanik (1961) geprägt, um regulatorische Phänomene zu beschreiben, die bei verschiedenen Mikroorganismen zu beobachten sind:

Zucker als Kohlenstoffquellen, vor allem Glukose ("glucose effect") hemmen bei Bakterien und Hefen die Synthese verschiedener Enzymsysteme, insbesondere solcher, die an der oxidativen Energiegewinnung beteiligt sind; gleichzeitig wird die Synthese anderer Enzyme, die am glykolytischen Abbau der Zucker beteiligt sind, stimuliert.

Glukose bedingt bei der Hefe Repression von Enzymsynthesen und Inaktivierung von vorhandenen Enzymen (Holzer, 1976). Dieses als Katabolit-Inaktivierung bezeichnete regulatorische Phänomen in der Hefe beeinträchtigt Enzyme der Glukoneogenese (Fructose-1,6-diphosphatase, Gancedo, 1971) und des Citrat- und Glyoxylat-Zyklus wie Malatdehydrogenase (Ferguson et al., 1967) und Isocitratlyase (Duntze et al., 1969).

Das Interesse der vorliegenden Arbeit galt vorwiegend der reprimierenden Wirkung, die Glukose auf die Synthese von mitochondrialen Komponenten bei der Bäckerhefe Saccharomyces cerevisiae ausübt. In den letzten Jahren beschäftigten sich einige Arbeitsgruppen mit dem Effekt der Glukose-repression, der eine pleiotrope Verringerung von Aktivitäten vieler Funktionen in den Mitochondrien, insbesondere der Atmungskette, verursacht:

1. Die Atmungsaktivität (Jayaraman et al., 1966) und der Cytochromgehalt (Bleeg et al., 1972; Perlman und Mahler, 1974)

werden reduziert.

2. Verschiedene Enzymaktivitäten des Citrat- und Glyoxylat-Zyklus werden reprimiert oder inaktiviert (Polakis und Bartley, 1965; Polakis et al., 1965; Witt et al., 1966; Chapman und Bartley, 1968; Beck und von Meyenburg, 1968; Holzer, 1976).

3. Eine Verringerung in der Anzahl, veränderte Morphologie und Dichte der Mitochondrien ist in reprimierten Hefezellen im Vergleich zu dereprimierten zu erkennen (Jayaraman et al., 1966; Neal et al., 1971; Stevens, 1974).

4. Der mitDNS-Gehalt relativ zur nucDNS (Bleeg et al., 1972; Böker et al., 1976) und die Aktivität der mitochondrialen RNS-Synthese (South und Mahler, 1968) wird verringert.

5. Hefen zeigen ähnlich wie Bakterien (Makman und Sutherland, 1965) eine Abnahme des intrazellulären cAMP Gehalts während der Glukoserepression (Cheung, 1966). Einen Anstieg von cAMP bei Verringerung der Repression beobachteten Wijk und Kronijn (1971) und Sy und Richter (1972). Zugabe von extrazellulärem cAMP hebt die Repression bestimmter Enzymsynthesen sowohl bei Bakterien (Ullmann und Monod, 1968) wie bei Hefen auf (Chandrasekaran und Jayaraman, 1978; Mahler und Lin, 1979) und stimuliert die Atmungsaktivität (Fang und Butow, 1970). Bisher konnte aber keine eindeutige Korrelation der Glukoserepression mit dem cAMP Gehalt der Zelle bei Hefen nachgewiesen werden.

Im Gegensatz zu den vielen biochemischen Untersuchungen zur Katabolitrepression gibt es nur wenig Information über eine mögliche genetische Steuerung dieses regulato-

rischen Phänomens in der Hefezelle. Eine Reihe von Mutanten wurden beschrieben (Montenecourt et al., 1973; Zimmermann und Eaton, 1974; Schamhart et al., 1975; Ciriacy, 1976; Rytka et al., 1976; Zimmermann und Scheel, 1977; Entian et al., 1977), die eine veränderte Katabolitrepression in der Synthese eines oder mehrerer Enzyme aufweisen. Diese regulatorischen Mutanten konnten nicht zur Klärung der Frage nach der genetischen Steuerung der Repression/Derepression von Funktionen im mitochondrialen Bereich beitragen.

Bisher ist nur von Ciriacy (1977) ein Selektionssystem zur Isolierung von ccr^- Mutanten, deren mitochondriale Funktionen konstitutiv dereprimiert sind, beschrieben worden. Dazu wurden Hefestämme mit einem Defekt in der Aktivität der Alkoholdehydrogenase (ADH^- Stämme) verwendet. Diese ccr^- Mutanten zeigen nicht den "idealen" ccr^- Phänotyp, da die Stimulation der CO_2 -Produktion durch Glukose geringer ist im Vergleich zum Wildtyp. Die anderen untersuchten cytoplasmatischen Funktionen verhalten sich während der Glukoserepression ähnlich wie beim Wildtyp. Die Begrenzung der Katabolitrepression im wesentlichen auf das cytoplasmatische System, also nicht der mitochondrialen Kontrolle unterliegenden Funktionen, kann als Hinweis auf eine autonome, genetische Steuerung der Repression/Derepression im mitochondrialen Bereich angesehen werden.

Unterstützt wird diese Annahme durch experimentelle Befunde über die Veränderung der mitochondrialen Proteinsynthese während der Repression und Derepression. Kurz-

fristig nach Zugabe von Glukose zu dereprimierten Hefezellen ist eine starke Reduzierung der mitochondrialen Proteinsynthese zu beobachten, die allen anderen bisher untersuchten Veränderungen im mitochondrialen Bereich vorangeht (Böker et al., 1976). Daraus kann geschlossen werden, daß die Hemmung der mitochondrialen Proteinsynthese - wahrscheinlich als Folge verringerter Transkription mitochondrialer Gene - eine zentrale Rolle im Prozeß der Repression bei der Hefe Saccharomyces cerevisiae spielt.

Die bisher beschriebenen Untersuchungen zur Katabolit-repression haben hier zur Aufstellung einer Arbeitshypothese angeregt:

" Eine Repression auf dem Niveau mitochondrialer Genexpression, das ein System der genetischen Steuerung erfordert, ist als wesentliche Ursache für die pleiotropen Effekte der Glukose-Katabolit-repression im mitochondrialen Bereich anzusehen".

Im Rahmen dieser Arbeit sollte versucht werden, mit Hilfe von Mutanten, deren mitochondriale Funktionen konstitutiv dereprimiert sind, Informationen zu erhalten, die Aussagen über die Art des Steuerungssystems der Glukose-Katabolit-repression zulassen. Ein gut Glukose-reprimierbarer Wildtypstamm der Hefe Saccharomyces cerevisiae wurde mit dem Mutagen NG behandelt und anschließend die TTC-Färbemethode (Ogur et al., 1957) in abgewandelter Form als

Selektionssystem zur Isolierung der gesuchten ccr^- Mutanten angewendet. An diesen Mutanten sollten folgende Untersuchungen durchgeführt werden:

1. Die ccr^- Mutation(en) in der nuc- oder mitDNS zu lokalisieren und die Rezessivität oder Dominanz zu bestimmen. Die Genetik solcher Mutationen lassen wahrscheinlich Hinweise auf die Art des genetischen Steuerungssystems der Katabolitrepression erkennen.

2. Bestimmung von mitochondrialen und cytoplasmatischen Syntheseleistungen, die durch Glukose reprimierbar sind, sollten bei den ccr^- Mutanten im Vergleich zum Wildtyp durchgeführt werden. Zeigen diese Mutanten eine Begrenzung der Katabolitrepression auf das cytoplasmatische System, d.h. konstitutiv dereprimierte Funktionen im mitochondrialen Bereich, ist eine genetische Steuerung der Repression/Derepression auf dem Niveau der mitochondrialen Genexpression vorstellbar.

M A T E R I A L U N D M E T H O D E N

1. Stämme

Für die Isolierung von Mutanten und für biochemische Studien wurde in dieser Arbeit folgender Stamm der Bäckerhefe Saccharomyces cerevisiae verwendet:

SM 11-6C a ura^{-} cap^{r} ana^{r} (Schweyen et al., 1976)

Als Kreuzungspartner diene:

IL 993-5C α ilv⁻ ery⁻ bli^r par^r (Welf et al., 1973)

2. Genetische Symbole

a und d bezeichnen den Paarungstyp, ana^r, cap^r, ery^r, oli₁^r, und par^r bezeichnen mitochondriale Mutationen, die die Resistenz gegen Antibiotika Antimycin (ana^r), Chloramphenicol (cap^r), Erythromycin (ery^r), Oligomycin (oli₁^r) und Paromomycin (par^r) hervorrufen.

rho⁺ / rho⁻ atmungskompetente/atmungsdefekte Hefezellen; rho⁻ mitDNS weist Makrodeletionen verschiedener Größe und Lage auf. Diese Deletionen bedingen den Verlust eines funktionsfähigen Translationssystems in den Mitochondrien.

rho⁰ Charakterisiert den vollständigen Verlust der mitDNS.

"petite" Im Zusammenhang mit dieser Arbeit
als Synonym für ρ^- / ρ^0 .

```
ccr      "carbon catabolite repression"
```

ccr⁺ / ccr⁻

Hefezellen mit normal ablaufender Glukose-Katabolitrepression/ Veränderungen in der Katabolitrepression.

3. Medien

a) YPD-Medium

Yeastextrakt	10	g
Agar (KobeI)	20	g
Glukose	30/75	g
H ₂ O dest.	ad	1 Ltr.

Glukose wurde nach dem Autoklavieren steril zugegeben.

b) YPGal-Medium

wie YPD-Medium, statt Glukose 30 g Galaktose.
Galaktose wurde nach dem Autoklavieren steril zugegeben.

c) YPG-Medium

wie YPD-Medium, statt Glukose 30 ml Glyzerin.

d) YNB-Agar

Yeast Nitrogen Base (Difco)	7	g
Agar (Difco)	20	g
Glukose	30	g
H ₂ O dest.	ad	1 Ltr.

e) Glukose-Minimal-Agar

Yeast Nitrogen Base (Difco)	7	g
Caseinhydrolysat	3	g
Glukose	30	g
H ₂ O dest.	ad	1 Ltr.

f) Glyzerin-Minimal-Medium

wie Glukose-Minimal-Medium, statt Glukose wurde 30 ml Glyzerin zugesetzt.

g) YPGD-Medium

wie YPG-Medium mit 0,1 % Glukose

h) Glucosamin-Medium

YPD-Medium

YPGal-Medium

YPG-Medium

D(+) Glucosamin (200 µg/ml) wurde dem Flüssigmedium zugesetzt.

i) Antibiotika-Medium

YPG-Agar

Phosphatpuffer 50 mM pH 6,2

Antibiotika wurden zu folgenden Endkonzentrationen gegeben:

Antimycin A (0,1 µg/ml); Chloramphenicol (4 mg/ml); Erythromycin (2 mg/ml); Oligomycin (3 µg/ml); Paromomycin (2 mg/ml).

j) TTC-Overlay-Agar

Bacto-Agar 15 g

Phosphatpuffer 0,067 M pH 7

TTC 1 g

H₂O dest. ad 1 Ltr.

TTC= 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid wurde nach dem Autoklavieren dem 40°C heißen Agar zugesetzt.

k) Acetat-Agar

Na-Acetat 4 g

Agar (Difco) 20 g

H₂O dest. 1 Ltr.

Für Flüssigmedien wurden dieselben Medien wie beschrieben verwendet, nur ohne Zusatz von Agar.

4. Pufferlösungen

a) Phosphatpuffer 1 M pH 6,2

Phosphatpuffer 1 M pH 7,0

nach Sørensen (KH₂PO₄/Na₂HPO₄)

b) TGM-Puffer pH 9,3

Na-thioglycolat	11,5	g
Tris-Base	2,42	g
H ₂ O dest.	ad 1	Ltr.

pH 9,3 wurde durch Zugabe von NaOH eingestellt.

c) AM-Puffer pH 5,8

Sorbitol	270	g
EDTA	0,372	g
Citronensäure	2,1	g
K ₂ HPO ₄	1,14	g
H ₂ O dest.	ad 1	Ltr.

d) BM-Puffer pH 6,4

Sorbitol	270	g
EDTA	0,372	g
H ₂ O dest.	ad 1	Ltr.

e) Lysis-Puffer pH 8,0

NaCl	5,84	g
Tris HCl	50 mM	pH 8,0
EDTA	50 mM	pH 8,0
Sarkosyl	2	g
H ₂ O dest.	100	ml

f) Scintillations-Mix

PPO	4	g
Dimethyl POPOP	0,1	g
Toluol	ad 1	Ltr.

5. Feinchemikalien

DAPI= 4',6-diamidino-2-Phenylindol wurde von Prof.Dann (Erlangen) zur Verfügung gestellt.

Alle Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt) und Serva (Heidelberg) bezogen. Die radioaktiven Isotope wurden von der Firma Amersham Buchler und Co KG (Braunschweig) geliefert.

6. Methoden

6.1. Zellkulturen und Wachstumskurven

Zellen der Hefe Saccharomyces cerevisiae wurden unter kräftigem Schütteln in Erlenmeyerkolben mit flüssigem Hefeextrakt bei 23°C gezüchtet. Als Kohlenstoffquelle diente 3% Glycerin, 3% Galaktose oder Glukose in verschiedenen Konzentrationen (3%, 5%, 7,5%, 10%). Zusätzlich wurden einer wachsenden Hefekultur in Glycerinmedium verschiedene Konzentrationen D(+)Glucosamin (100 µg/ml, 200 µg/ml, 350 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml) zugegeben. Glucosamin hemmt das Wachstum der Hefezellen in nicht vergärbaren Substraten (Elliot und Ball, 1973).

Das Wachstum der Kulturen konnte durch Auszählen der Zellen im Hämatocytometer oder durch Messung der optischen Dichte in einem Eppendorf-Photometer bei einer Wellenlänge von 578 nm bestimmt werden. Die Verdopplung der Zellzahl wurde als Wachstum einer Zellgeneration definiert.

6.2. ITC-Overlay-Agar-Methode

Zellkulturen wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase in Glycerin - Flüssigmedium gezüchtet und geeignet verdünnt, sodaß nach Plattierung auf YPD-(7,5% Glukose)Platten und Bebrütung bei 23°C ca 100 Kolonien/Platte wuchsen; diese wurden auf YPG-und YPD-Platten gestempelt. Nach einem Tag Bebrütung der YPD-Platten und 2-3 Tagen Bebrütung der Glycerinplatten wurden diese mit 40°C heißem Agar (Ogur et al., 1957) überschichtet. Eine Stunde nach der Überschichtung wurden Unterschiede in der Rotfärbung der Kolonien auf YPG- und YPD-Platten ausgewertet.

Die unterschiedliche Rotfärbung der Zellen basiert im wesentlichen darauf, daß stark atmende Zellen TTC rasch zu 2,3,5-Triphenyl-Formazan reduzieren (Nachlas et al., 1960; Slater et al., 1963; Clark et al., 1965). Formazan lagert sich in den Zellen als roter, unlöslicher Farbstoff ab. Mit dieser Selektionsmethode können stark atmende, dereprimierte (rote) und schwach atmende, reprimierte oder atmungsdefekte (weiße) Kolonien auf Glukose-Platten unterschieden werden (Raut et al., 1953; Bachhofen et al., 1972).

6.3. Isolierung konstitutiv dereprimierter Mutanten

Zellen des Stammes SM 11-6C wurden in 5% Glukosemedium bis zur stationären Phase bei 23°C gezüchtet, abzentrifugiert und in frischem Glukosemedium aufgenommen (Endkonzentration 1×10^8 Zellen/ml). Die Hefekultur wurde 2 Stunden bei 30°C mit CHX (1mg/ml) inkubiert, anschließend 60 Minuten mit dem Mutagen N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (NG 100µg/ml) behandelt und danach 3x mit H₂O dest. gewaschen. Das Pellet wurde in 7,5% Glukosemedium zu einem Titer von 2×10^6 Zellen/ml aufgenommen. Nach Aufteilung der Proben und einigen Zellverdopplungen wurden die Zellen geeignet verdünnt und auf 7,5% Glukoseplatten plattiert. Die gewachsenen Kolonien wurden mit TTC-Agar überschichtet. Rote Kolonien wurden abisoliert, in YPG-Medium bis zur logarithmischen Phase gezüchtet, geeignet verdünnt und auf YPD-Platten plattiert. Nach Wachstum der Kolonien wurden sie auf YPD- und YPG-Platten gestempelt und 2-3 Tage bebrütet. Anschließend erfolgte eine Überschichtung mit TTC-Agar. Nur wenige Kolonien zeigten nach der TTC-Behandlung auf YPD-Platten die gleiche starke Rotfärbung wie

auf YPG-Medium. Diese roten Kolonien wurden vorläufig als nicht durch Glukose reprimierbare Mutanten angesehen und abisoliert. Sie wurden auf 7,5% Glukoseplatten ausgestrichen, um Einzelkolonien zu erhalten. Nach Wachstum der Kolonien wurden sie auf YPG- und YPD-Platten gestempelt und erneut mit TTC-Agar überschichtet. Zeigte ein Isolat nach diesem TTC-Test gleiche Rotfärbung nach Wachstum in Glukose- und Glycerin-Medium, so wurde es als konstitutiv dereprimierte Mutante (ccr^-) abisoliert.

6.4. Kreuzungen und Tetradenanalyse

Kulturen der ccr^- Mutanten und des Kreuzungspartners IL 993-5C wurden in flüssigem YPD-Medium bis zur späten logarithmischen Phase gezüchtet. Etwa 1×10^7 Zellen/ml jedes Kreuzungspartners wurden gemischt und in 3ml Glukosemedium aufgenommen. Das Zentrifugat (Pellet und Überstand) wurde dann 4-8 Stunden bei 30°C inkubiert. In dieser Zeit trat Zygotenbildung ein. Danach wurde der Überstand abgegossen, das Pellet wurde in 3ml Minimalmedium aufgenommen und weitere 2-3 Tage bei 30°C inkubiert. In diesem Medium wachsen nur die Zygoten und ihre diploiden Nachkommen, da sie auf Grund von Komplementation im Gegensatz zu den haploiden Elternstämmen prototroph sind. Die Nachkommenschaft der Zygoten wurde nach geeigneter Verdünnung auf Minimal-Agar ausplattiert und bei 30°C bebrütet. Die diploiden Nachkommen wurden zur Kontrolle auf Antibiotika-Platten gestempelt, um Segregation der mitochondrialen Marker in resistente und sensible Kolonien zu testen.

Zur Tetradenanalyse wurde von jeder Kreuzung eine diploide Kolonie abisoliert und in flüssigem YPD-Medium bis zur sta-

tionären Phase gezüchtet. Die Zellen wurden abzentrifugiert, gewaschen und in 0,2 ml H_2O dest. auf Acetat-Agar ausgetropft. Innerhalb von 2-3 Tagen trat Sporulation der Diploiden ein. Diese wurden zur Tetradenanalyse in 1 ml H_2O dest. suspendiert und mit 50 μ l Helicase (Boehringer, Mannheim) 20 Minuten inkubiert, um die Ascuswände anzudauen. Mit Hilfe eines Mikromanipulators (Leitz) wurden die vier Sporen eines Ascus von der Ascuswand befreit und auf YPG-Platten in bestimmten Abständen verteilt. Die Sporen wuchsen nach 2-3 Tagen Bebrütung bei $23^{\circ}C$ zu Kolonien heran, die durch Stempeln auf Selektionsmedien auf ihren Paarungstyp, ihre Auxotrophie, mitochondriale Marker und auf ihre Reprimierbarkeit durch Glukose (ccr^{-} oder ccr^{+}) getestet wurden.

6.5. Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs und der CO_2 -Produktion

Bis zu einem Zelltitert von 3×10^6 Zellen/ml wurden die Zellen der ccr^{-} Mutanten und des Wildtyps SM 11-6C in Glyzerinmedium gezüchtet. Die dereprimierten Kulturen wurden jeweils in drei Proben aufgeteilt, denen 7,5% Glukose oder 3% Galaktose zugesetzt wurde. Die dritte Probe wuchs zur Kontrolle in Glyzerinmedium weiter. Alle 60 Minuten wurde in einem geschlossenen Gefäß (2 ml Testvolumen) mit einer Sauerstoffelektrode (Eschweiler) bei $23^{\circ}C$ der Sauerstoffverbrauch dereprimierter und reprimierter Kulturen polarographisch gemessen.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde die Mutante $ccr-91$ und der Wildtyp wie oben beschrieben in Glyzerinmedium

gezüchtet. Die Kulturen wurden jeweils in Proben aufgeteilt, denen Glucosamin (200 µg/ml), 7,5% Glukose, 7,5% Glukose + Glucosamin (200 µg/ml), 3% Galaktose oder 3% Galaktose + Glucosamin (200 µg/ml) zugesetzt wurde. Glucosamin hemmt nicht das Wachstum der Hefezellen in vergärbaren Substraten, reduziert aber sehr stark die Atmungsaktivität (Furst und Michels, 1977). Eine Probe wuchs als Kontrolle in Glycerinmedium weiter. Alle 60 Minuten wurde der Sauerstoffverbrauch polarographisch gemessen.

Gleichzeitig wurde das Wachstum der Zellen durch Messung der optischen Dichte in einem Eppendorf-Photometer bestimmt (vgl. Material und Methoden, Kapitel 5.1.). Daraus konnte die Generationszeit der Zellkulturen in Wachstumsmedien mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen (Glycerin, Galaktose, Glukose) errechnet werden. Die Werte des Sauerstoffverbrauchs ($\mu\text{mol O}_2 / \text{min} \times 10^7 \text{ Zellen}$, Estabrook, 1967) wurden in Abhängigkeit zum Zellwachstum aufgetragen.

Die CO_2 - Produktion und der Sauerstoffverbrauch wurden gleichzeitig manometrisch in einem Standard-Warburg-Apparat (in Zusammenarbeit mit Dr. M. von Ciriacy, Darmstadt) bei 30°C in flüssigem YPD-Medium (4% Glukose) bei pH 5 bestimmt. Die Zellen der Mutanten ccr-91 und ccr-94 und des Wildtyps SM 11-6C wurden dafür bis zu einem Titer von $2-3 \times 10^6 \text{ Zellen/ml}$ in Glycerinmedium gezüchtet. Die erste Messung wurde noch bei Wachstum der Zellen in Glycerinmedium durchgeführt. Nach 30 Minuten wurde dann den dereprimierten Zellen Glukose (Endkonzentration 4%) zu-

gesetzt und bis zur stationären Wachstumsphase der Zellen alle 30 Minuten der Sauerstoffverbrauch und die CO_2 - Produktion ($\mu\text{mol CO}_2/\text{min} \times 10^7$ Zellen) gemessen. Gleichzeitig wurde die Wachstumsrate photometrisch in parallelen Kulturen bestimmt.

6.6. Anwendung der DAPI-Fluoreszenzmetnode nach Williamson und Fennell

Kulturen des Wildtyps und der ccr^- Mutanten wurden in Glycerinmedium bis zur frühen stationären Phase gezüchtet, geeignet verdünnt und jeweils in zwei Proben aufgeteilt. Einer Probe wurde dann 7,5% Glukose zugesetzt, die andere wuchs als Kontrolle in Glycerinmedium weiter. Alle 2 Stunden wurde jeder Probe 2-3 ml Zellsuspension entnommen und bei $2000 \times g$ 5 Minuten abzentrifugiert. Das Pellet wurde einmal in H_2O dest. gewaschen, in 4 ml Äthanol (70%) aufgenommen, 30 Minuten stehen gelassen, abzentrifugiert ($2000 \times g$, 5 Minuten) und 2x in H_2O dest. gewaschen. Das Pellet wurde anschließend in 25% Glycerin mit 4',6-diamidino-2-Phenylindol (DAPI 0,1-0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) aufgenommen, einem fluoreszierenden Farbstoff, der sich spezifisch an die DNS anlagert. Die Beobachtung der Fluoreszenz erfolgte in einem Fluoreszenzmikroskop (Firma Leitz, Typ Loguy, Filtersystem A der Firma Leitz). Im mikroskopischen Bild sind in den dereprimierten Wildtypzellen ein großer, fluoreszierender Körper, der Kern, und zahlreiche kleine, cytoplasmatische Strukturen, wahrscheinlich Aggregate der mitochondrialen DNS zu beobachten (Williamson und Fennell, 1975). Die Anzahl der fluoreszierenden, cytoplas-

matischen Strukturen wurde während des Wachstums der ccr^{-} Mutanten und des Wildtyps in Glukose- und Glycerinmedium bestimmt.

6.7. Tieftemperatur-Spektroskopie an ganzer Zeller

Zellen der konstitutiv dereprimierten Mutanten und des Wildtyps wurden in flüssigem YPD-(7,5%), YPGal-(3%) und in Glycerinmedium bis zur logarithmischen Wachstumsphase ($1-2 \times 10^7$ Zellen/ml) gezüchtet. Die Kulturen wurden abzentrifugiert ($8000 \times g$, 5 Minuten) und das Pellet in 50% Glycerin aufgenommen (Endkonzentration $3-4 \times 10^9$ Zellen/ml). Als Reduktionsmittel diente Dithionit, als Referenz wurde ein weißes Papier verwendet, das die Trübung der Suspension kompensierte. Nach 2-5 Minuten Einwirkung des Reduktionsmittels wurde die Meßprobe in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Differenzspektren der Cytochrome wurden in einem Zweistrahl-spektralphotometer (Shimadzu UV 210), das im Eigenbau (Dr. B.Lang) für Tieftemperaturspektroskopie umgebaut wurde, bei $77^{\circ}K$ aufgezeichnet. Mit Hilfe der Basislinienkorrektur und der Nullpunktsunterdrückung wurde der richtige Meßbereich eingestellt und bei einer Wellenlänge von 620 bis 500 nm gemessen.

6.8. Bestimmungsmethoden

- a) Proteine wurden nach der Methode von Lowry et al.(1951) in einem Photometer (PMQ, Firma Zeiss) bestimmt.
- b) Maltaseaktivität wurde an ganzen Zellen nach der von Zimmermann und Eaton (1974) beschriebenen Methode gemessen.

- c) Die Bestimmung der Malatsynthaseaktivität erfolgte nach der Methode von Dixon und Kornberg (1959).
- d) Nach der Methode von Arrigoni und Singer (1962) wurde an isolierten Mitochondrien die Succinat-Cytochrom-c-Oxido-Reduktase (SDH) mit Cytochrom c als Elektronenakzeptor gemessen. Zur Isolierung der Mitochondrien wurde differentielle Zentrifugation (Kováč et al., 1972) angewendet.
- e) Die Bestimmung der Malat-Dehydrogenaseaktivität (MDH) erfolgte im Zellextrakt (Ciriacy, 1975b) nach der Methode von Ochoa (1955).

5.9. Einbau radioaktiv markierter Aminosäuren in ganze Zellen

Zellkulturen der ccr⁻Mutanten und des Wildtyps wurden in YNB-Flüssigmedium mit 3% Glycerin bis zu einem Titer von $2-3 \times 10^7$ Zellen/ml bei 23°C gezüchtet. Die Kulturen wurden in drei Proben à 100 ml aufgeteilt (Endkonzentration 1×10^7 Zellen/ml). Den Proben wurde 7,5% Glukose oder 3% Galaktose zugesetzt und eine Kultur wuchs als Kontrolle in Glycerinmedium weiter. Die Entnahme der Proben (1 ml Zellsuspension pro Wassermannröhrchen) und die Zugabe von ³H-Leucin (0,7µCi/ml, spez. Aktivität 60 Ci/mMol) erfolgte zu den Zeiten 0,1, 2,3,4,5,6,7,8 und 10 Stunden Wachstum der Zellen in Glukose-Galaktose- oder Glycerinmedium. Die Zugabe von CHX-Lösung (1mg/ml) erfolgte 3 Minuten und von ERY-Lösung (200mg/ml) 10 Minuten vor der Markierung der Zellen mit ³H-Leucin. Nach 45 Minuten Inkubation mit ³H-Leucin wurden alle Synthesen durch Zugabe von 50% TCA gestoppt. Die Proben wurden in einem 90°C heißen Wasserbad 20 Minuten erhitzt, abfil-

triert (Filteranlage, Firma Hölzl) und getrocknet. Die Radioaktivität der Proben wurde in Scintillationsgefäßen mit 3 ml Toluol + PPO + POPOP in einem Scintillationszähler (Isocap/300, Firma G.D.Searle GmbH) bestimmt.

6.10. Radioaktive Markierung der Hefe-DNS

Kulturen des Wildtyps SM 11-6C und der ccr^- Mutanten wurden in YNB-Flüssigmedium mit 3% Glyzerin und 0,3% Casein (10%) bis zu einem Zelltitert von 5×10^6 Zellen/ml gezüchtet. Anschließend wurden die Zellen mit ^{14}C -Adenin ($0,1 \mu\text{Ci/ml}$) über Nacht bei 23°C inkubiert. Die Zellkulturen wurden abzentrifugiert ($7000 \times g$, 10 Minuten) und einmal in YNB-Medium gewaschen. Das Pellet wurde aufgeteilt und in YNB-Medium mit Glyzerin, Galaktose oder mit 7,5% Glukose und 0,3% Casein suspendiert (Endkonzentration $1-5 \times 10^7$ Zellen/ml). Zu den angegebenen Zeiten wurden Proben entnommen, abzentrifugiert und in 1 ml Flüssigmedium (wie oben beschrieben) mit ^3H -Adenin ($10 \mu\text{Ci/ml}$) 45 Minuten inkubiert.

a) Protoplastierung der Hefezellen

Für die anschließende Protoplastierung der Hefezellen fand die Methode von Kováč et al. (1972) in abgeänderter Form Verwendung (Doxiadis, Diss., 1978). Die mit ^3H -Adenin inkubierten Zellproben wurden abzentrifugiert ($3000 \times g$, 5 Minuten, 4°C) und einmal in Phosphatpuffer pH 6,2 gewaschen. Das Pellet wurde in TMG-Puffer pH 9,3 aufgenommen, 30-40 Minuten bei 23°C geschüttelt, danach abzentrifugiert ($3000 \times g$, 5 Minuten) und zweimal in Phosphatpuffer pH 6,2 gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit AM-Puffer pH 5,8

und Helicase (β -Glucuronidase, Arylsulfatase) mit einer Endkonzentration von 10% behandelt. Die Einwirkungsdauer des Enzyms betrug je nach Zustand der Zellen 10-30 Minuten. Die Unterbrechung der Enzymreaktion erfolgte, wenn 70% der Zellen im Lichtmikroskop als Protoplasten erkennbar waren. Die Zellsuspension wurde abzentrifugiert (2500 x g, 5 Minuten), das Pellet wurde einmal in BM-Puffer pH 6,4 gewaschen und in Lysis-Puffer pH 8,0 aufgenommen. Dies führte zur Lyse der Protoplasten, aber nicht zur Lyse der Mitochondrien.

b) Dichtegradientenzentrifugation

Zu lysierten Protoplasten wurde Ethidium-Bromid (1 μ g/ml) zugegeben, anschließend mit einer gesättigten NaJ-Lösung eine Dichte von 1,4295 (25°C) eingestellt. Die Dichtekontrolle erfolgte im Refraktometer. Die Zentrifugation des NaJ-Gradienten erfolgte bei 21°C, 40.000 rpm für 63 Stunden in einer Beckman Ultrazentrifuge Modell L 5-50 in einem Ti-50 Rotor.

c) Behandlung von markierter DNS aus dem Gradienten

Nach der Zentrifugation wurde der NaJ-Gradient durch Anstechen mit einer Nadel ausgetropft. Die Fraktionen wurden mit 1ml 1N NaOH versetzt und 60 Minuten bei 60°C zur Hydrolyse der RNS stehen gelassen. Die abgekühlten Proben wurden mit TCA (20%) und 0,1% BSA behandelt, die Fraktionen filtriert, mit 5% TCA + 0,1% $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ und mit Äthanol gewaschen und bei 60°C getrocknet.

Die Messung der Radioaktivität erfolgte nach Zugabe von 3ml Scintillations-Mix in einem Isocap-Scintillationszähler. Die Verteilung der Radioaktivität im Gradienten wur-

de wie in Abb. 20 dargestellt aufgezeichnet. Aus dieser Darstellung geht hervor, daß zwei Maxima auftreten, das erste mit hoher Dichte stellt die nucDNS und das zweite die mitDNS dar. Die Berechnung des prozentualen Anteils der mitDNS wurde nach Addition aller cpm von beiden Maxima (nuc- und mitDNS) durchgeführt (Doxiadis, Diss., 1978).

6.11. Kontrollen und Bestimmung der ρ -Bildung

Die zu untersuchenden Zellkulturen wurden mikroskopisch auf das Vorhandensein von Bakterien untersucht. Zur Kontrolle der Reinheit der haploiden Stämme wurde je ein Tropfen Suspension auf Minimalagar ausgetropft.

Um den Anteil der atmungsdefekten Kolonien zu bestimmen, wurden aus wachsenden Glukosekulturen 100 Zellen/Platte auf YPGD (0,1% Glukose)-Medium plattiert. Auf differentiellen Medien wachsen atmungskompetente Zellen zu großen Kolonien heran, atmungsdefekte können wegen der limitierenden Glukosekonzentration (0,1% Glukose) nur kleine glasige Kolonien bilden.

7. Abkürzungen

BSA	Rinderserumalbumin
CHX	Cycloheximid
cAMP	cyclisches 3',5'-Adenosin Monophosphat
cpm	counts pro Minute
EB	Ethidium Bromid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERY	Erythromycin
DAPI	4',6-diamidino-2-Phenylindol

DNS	Desoxyribonucleinsäure
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
KCN	Kaliumcyanid
M	Molare Konzentration
mM	millimolare Konzentration
min	Minute
<u>mit</u> DNS	mitochondriale DNS
NaJ	Natriumjodid
NG	N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin
<u>nuc</u> DNS	nucleare(Kern) DNS
POPOP	1,4-Di-2-(5-Phenyloxazol)-Benzol
PPO	2,5-Diphenyloxazol
RNS	Ribonucleinsäure
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TTC	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid
<u>tot</u> DNS	gesamte Hefe-DNS
Ipm	Impulse pro Minute

ERGEBNISSE

1. Isolierung konstitutiv dereprimierter Mutanten

1. Charakterisierung eines optimal Glukose-Katabolit-reprimierten Stammes der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*

Das Wachstum von Hefezellen in vergärbaren Substraten bewirkt einen pleiotropen Effekt im mitochondrialen Bereich: Atmung, oxidative Phosphorylierung, Cytochromgehalt und die Aktivität einer Vielzahl von cytoplasmatischen Enzymen sind im Vergleich zu in nicht vergärbaren Substraten gewachsenen Hefezellen gering (Polakis et al., 1965; Polakis und Bartley, 1965; Jayaraman et al., 1966; Witt et al., 1966; Beck und von Meyenburg, 1968; Bleeg et al., 1972; Perlman und Mahler, 1974).

Die Fähigkeit zur Glukose-Katabolit-repression ist bei verschiedenen Stämmen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* unterschiedlich stark ausgeprägt, wie an dem Grad ihrer Rotfärbung mit Hilfe der TTC-Technik (TTC-Overlay-Agar-Methode, Ogur et al., 1957) und ihres Sauerstoffverbrauchs nach Wachstum in Glukosemedium im Vergleich zu Glyzerin gewachsenen zu erkennen ist (Tabelle 1). Die unterschiedliche Rotfärbung der Zellen basiert im wesentlichen darauf, daß nur stark atmende (dereprimierte) Zellen TTC rasch zu 2,3,5-Triphenyl-Formazan reduzieren können. Formazan lagert sich als unlöslicher, roter Farbstoff in der Zelle ab (Nachlas et al., 1960; Slater et al., 1963; Clark et al., 1965).

Die Ergebnisse (Tabelle 1) zeigen, daß nur 5 von 18 untersuchten Stämmen der Bäckerhefe eine starke Repression im

Stamm	Wachstumsbedingung	Grad der Färb- barkeit nach TTC-Behandlung	O ₂ -Verbrauch 10=2 µmol O ₂ / minx10 ⁷ Zellen
SM 11-6C	dereprimiert	+++	5,8
	reprimiert	-	0,8
SM 302-1C	dereprimiert	+++	6,0
	reprimiert	-	2,2
SM 503-2A	dereprimiert	+++	5,6
	reprimiert	-	0,8
SM 505-3C	dereprimiert	+++	5,9
	reprimiert	++	3,7
SM 821-2A	dereprimiert	++	4,6
	reprimiert	+	1,5
SM 1102-2B	dereprimiert	+++	6,3
	reprimiert	+	1,6
SM 1313-1A	dereprimiert	+++	5,9
	reprimiert	++	3,2
IL 8-8C	dereprimiert	++	4,1
	reprimiert	-	1,5
IL 16-12C	dereprimiert	+++	6,4
	reprimiert	-	1,0
IL 125-10C	dereprimiert	+++	6,3
	reprimiert	-	1,0
IL 126-7A	dereprimiert	++	3,8
	reprimiert	+	1,9
IL 16-8C	dereprimiert	+++	5,2
	reprimiert	++	1,9
IL 167-4C	dereprimiert	++	4,0
	reprimiert	-	1,5
IL 216-1A	dereprimiert	+++	5,6
	reprimiert	+	2,0
IL 458-1A	dereprimiert	+++	6,0
	reprimiert	++	3,6
IL 478-8	dereprimiert	+++	5,3
	reprimiert	++	3,8
IL 993-5C	dereprimiert	+++	5,9
	reprimiert	-	0,8
KL 14-4A	dereprimiert	+++	5,3
	reprimiert	+	1,7

Tabelle 1: Grad der Repression nach Wachstum von Wildtyp-
stämmen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*.

Zellkulturen wurden in YPG-Medium gezüchtet und jeweils einer Probe wurde 7,5% Glukose zugesetzt. Nach 3-4 Zellverdopp-
lungen in YPD-Medium wurde der Sauerstoffverbrauch (µmol O₂/
min x 10⁷ Zellen) im Vergleich zu YPG-Medium gewachsenen Zellen
bestimmt. Der unterschiedliche Grad der Rotfärbung wurde
während des Wachstums der Kolonien auf YPD-(7,5% Glukose)
und YPG-Platten mit Hilfe der TTC-Overlay-Agar-Methode (Ogur
et al., 1957) getestet.

+++ = starke Rotfärbung der Kolonien
++ = Rotfärbung der Kolonien
+ = hell - rote Färbung der Kolonien
- = keine Rotfärbung der Kolonien

dereprimiert = in YPG-Medium gewachsene Zellen

reprimiert = in YPD (7,5% Glukose)-Medium gewachsene Zellen

Sauerstoffverbrauch nach Wachstum der Zellen in 7,5% Glukosemedium im Vergleich zu in Glycerinmedium gewachsenen Zellen zeigen. Bei diesen 5 Stämmen sind die Unterschiede in der Färbung nach TTC-Behandlung zwischen in Glukose- und Glycerinmedium gewachsenen Zellen am deutlichsten ausgeprägt. Einer dieser Stämme soll im folgenden zur Isolierung von Mutanten verwendet werden, die unabhängig von der Kohlenstoffquelle im Wachstumsmedium starke Rotfärbung nach TTC-Agar-Überschichtung zeigen, also wahrscheinlich konstitutiv dereprimiert sind.

2. Isolierung konstitutiv dereprimierter Mutanten

Der für die Mutantenisolierung ausgewählte Stamm SM 11-6C (Tabelle 1) wurde nach Mutagenese mit N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (NG) auf YPD-Medium (3% Glukose) plattiert. Die gewachsenen Kolonien wurden auf YPG- und YPD-Medium (7,5% Glukose) gestempelt und nach erneutem Wachstum der Kolonien mit TTC-Agar überschichtet (Abb.1) . Wie im folgenden Schema dargestellt, sollten bei den gesuchten Mutantenkolonien - im Gegensatz zum Wildtyp - keine Unterschiede in der Rotfärbung nach TTC-Behandlung auf YPG- und YPD-Platten zu erkennen sein.

Kohlenstoffquelle im Wachstumsmedium	Rotfärbung der Kolonien nach TTC-Behandlung Wildtyp (ccr^+)	Mutanten (ccr^-)
Glycerinmedium		
+ TTC-Agar	+++	+++
7,5% Glukosemedium		
+ TTC-Agar	-	+++

Mutagene Behandlung der Zellen des Stammes SM 11-6C mit dem Mutagen NG mit anschließender Zwischenbebrütung und Plattierung auf 7,5% Glukose-Platten

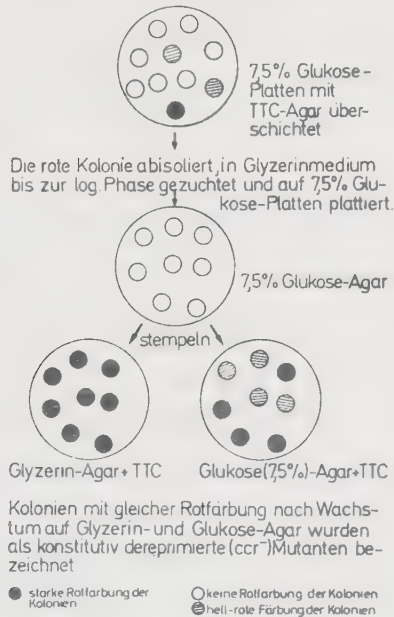


Abb. 1 Isolierung konstitutiv dereprimierter Mutanten

Zellen des Stammes SM 11-6C wurden in 5% YPD-Medium bis zur stationären Phase gezüchtet, abzentrifugiert und in frischem YPD-Medium aufgenommen (1×10^8 Zellen/ml). Die Kultur wurde 2 Stunden mit CHX (1mg/ml) inkubiert, anschließend 60 Minuten mit dem Mutagen NG (100µg/ml) behandelt, abzentrifugiert und mit H_2O dest. gewaschen. Das Pellet wurde in YPD-(7,5% Glukose) Medium aufgenommen (2×10^6 Zellen/ml). Nach Aufteilung der Proben und einigen Zellverdopplungen wurden die Zellen geeignet verdünnt und auf 7,5% YPD-Platten plattiert. Die gewachsenen Kolonien wurden mit TTC-Agar überschichtet. Rote Kolonien wurden abisoliert, in YPG-Medium bis zur logarithmischen Phase gezüchtet, in YPG-Medium verdünnt und auf 7,5% YPD-Platten plattiert. Nach Wachstum der Kolonien wurden sie auf YPD- und YPG-Platten gestempelt und 2-3 Tage bebrütet. Nach Überschichtung dieser Platten mit TTC-Agar wurden Kolonien mit gleicher Rotfärbung auf YPD- und YPG-Platten als vorläufig konstitutiv dereprimierte (crr^-) Mutanten abisoliert.

Diese ccr^- Mutantenkolonien treten nach einer Behandlung mit dem Mutagen NG in einer Häufigkeit von 0,1% - 1% auf. Aus einer größeren Serie wurden 4 Mutanten ausgewählt, die nach mehrmaliger Wiederholung des TTC-Färbetests dem gesuchten Mutantentyp optimal entsprachen. Sie wurden als konstitutiv dereprimierte Mutanten $ccr-91$, $ccr-92$, $ccr-93$ und $ccr-94$ bezeichnet und im folgenden genetisch und biochemisch charakterisiert.

II. Genetische Charakterisierung konstitutiv dereprimierter Mutanten

1. Bestimmung des Vererbungsmodus der ccr^- Mutation

Zur Bestimmung des Vererbungsmodus der ccr^- Mutation wurden alle Mutanten mit dem Wildtypstamm IL 993-5C gekreuzt, der sich nach den in Tabelle 1 dargestellten Ergebnissen als ähnlich stark reprimierbar wie der Stamm SM 11-6C erwiesen hat. Die diploiden Nachkommen wurden auf YPD-Medium (7,5% Glukose) plattiert und nach Wachstum der Kolonien mit TTC-Agar überschichtet. Es zeigte sich eine einheitliche Rotfärbung der Kolonien. Das Fehlen jeglicher mitotischen Segregation schließt eine mitochondriale oder andere extrakaryotische Vererbung aus. Denn im Falle einer extrakaryotischen Vererbung sollte Segregation, d.h. eine Aufspaltung der diploiden Segreganten (bis zu 50% ccr^+ (weiße) bzw. ccr^- (rote) Kolonien) zu beobachten sein.

Nach Meiose und Sporulation wurde eine Analyse der Tetraden durchgeführt. Bei einem karyotischen Vererbungsmodus

sollten 2 Sporen einer Tetrade durch Glukose reprimierbar (ccr^+) und 2 Sporen nicht reprimierbar (ccr^-) sein. Die Tetraden zeigten nach Wachstum auf YPD-Medium (7,5% Glukose) und Überschichtung mit TTC-Agar Überwiegend 2 rote (ccr^-) und 2 weiße (ccr^+) Sporen. Es konnten aber auch 3 : 1 (ccr^- : ccr^+) Sporenverhältnisse beobachtet werden (Tabelle 2), sowie einige Tetraden, die auf Grund nicht eindeutiger Färbung nur schwer einzuordnen waren.

Kreuzung	Anzahl getesteter Tetraden	Sporenverhältnis ccr^- : ccr^+ 1)		
		2 : 2	3 : 1	4 : 0
ccr-91 x IL 993-5C	25	18	7	0
ccr-92 x IL 993-5C	12	12	0	0
ccr-93 x IL 993-5C	15	12	3	0
ccr-94 x IL 993-5C	20	15	5	0

Tabelle 2 : Analyse von Tetraden aus Kreuzungen der Mutanten ccr-91, ccr-92, ccr-93 und ccr-94 mit dem Wildtypstamm IL 993-5C.

1) 1 : 3 und 0 : 4 Sporenverhältnisse wurden in den untersuchten Tetraden nicht gefunden.

Das Überwiegende Auftreten von 2 : 2 Sporenverhältnissen in den Tetraden weist auf Mutation nur eines Faktors hin. Das Vorliegen von zwei Mutationen, die den ccr^- Phänotyp bedingen, ist unwahrscheinlich. In einem solchen Fall sollten Tetraden mit 3 : 1 = 50% , 2 : 2 = 25% und 4 : 0 = 25% Spo-

renverhältnissen auftreten.

Die Abweichungen, d.h. das relativ häufige Vorkommen von 3 : 1 Sporenverhältnissen in der ersten Tetradenanalyse (Tabelle 2) kann mit der Benutzung nicht isogenischer Stämme (SM 11-6C und IL 993-5C) in den Kreuzungen erklärt werden. Die haploiden Nachkommen aus der Kontrollkreuzung ($ccr^+ \times ccr^+$) ließen nach Wachstum auf Glukosemedium und Überschichtung mit TTC-Agar überwiegend weiße, aber auch einige leicht rote Kolonien erkennen. Dies weist darauf hin, daß verschiedene, die TTC-Färbung modifizierende Faktoren in den Sporen neu kombiniert worden sind und so Abweichungen vom ccr^- bzw. ccr^+ Phänotyp verursachen.

Zur Überprüfung dieser Annahme wurden mehrere Rückkreuzungen von ccr^- Sporen mit dem Elternstamm SM 11-6C durchgeführt. Es sollte dann in zunehmend isogenischen Kreuzungen ein klares 2 : 2 Verhältnis der Sporen in den Tetraden erkennbar sein. In Tabelle 3 sind die Ergebnisse aus der 3. Rückkreuzung dargestellt. Ein eindeutiges 2 : 2 Verhältnis der ccr^- : ccr^+ Sporenphänotypen ist in allen untersuchten Tetraden zu beobachten.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die ccr^- Mutation in den untersuchten Mutanten einem karyotischen Erbgang entspricht. Der ccr^- Phänotyp wird hier wahrscheinlich nur durch die Mutation eines Faktors bedingt. Die ccr^- Mutation zeigt in allen 4 Mutanten ein dominantes Verhalten, da die diploiden Nachkommen aus den Kreuzungen $ccr^- \times ccr^+$ nach Wachstum auf YPD-Medium und Überschichtung mit TTC-Agar eine einheitliche Rotfärbung aufweisen.

Kreuzung	Anzahl getesteter Tetraden	Sporenverhältnis $ccr^- : ccr^+$		
		2:2	3:1	4:0
$ccr-91 \times$ SM 11-6C	16	15	1	0
$ccr-92 \times$ SM 11-6C	5	5	0	0
$ccr-93 \times$ SM 11-6C	5	5	0	0
$ccr-94 \times$ SM 11-6C	12	12	0	0

Tabelle 3:

Tetradenanalyse der 3. Rückkreuzung von ccr^- Sporen mit dem Elternstamm SM 11-6C.

2. Rekombinationsanalyse

Die diploiden Nachkommen aus den Kreuzungen der verschiedenen Mutanten untereinander ($ccr_i^- \times ccr_j^-$) ließen nach Wachstum auf Glukosemedium und Übersichtung mit TTC-Agar, ähnlich den Diploiden aus den Kreuzungen $ccr^- \times ccr^+$, eine einheitliche Rotfärbung erkennen. Diese Rotfärbung war selbst im Falle nicht alleler Mutanten zu erwarten, da beide Mutationen (ccr_i^- und ccr_j^-) sich über ccr^+ als dominant erwiesen haben.

Nach Meiose und Sporulation wurden für jede Kreuzung ca 200 Sporen untersucht. Es traten in keinem Fall durch Glukose reprimierbare (ccr^+) Nachkommen, also Rekombinanten auf. Die vier Mutationen ($ccr-91$, $ccr-92$, $ccr-93$ und $ccr-94$) sind

entweder allel oder liegen in eng gekoppelten Genen. Da diese 4 ccr^- Mutanten aus verschiedenen mit dem Mutagen NG behandelten Populationen isoliert wurden, ist anzunehmen, daß diese Mutationen jedoch nicht iso-allel sind. Diese Annahme wird durch später beschriebene physiologische Untersuchungen bestätigt.

3. Bestimmung der ρ^- Rate

Von jeder konstitutiv dereprimierten Mutante und vom Wildtyp SM 11-6C und IL 993-5C wurde die spontane ρ^- Bildungsrate untersucht. Aus einer wachsenden Glyzerinkultur wurden die Zellen auf differentiellles Medium (YPG + 0,1% Glukose) plattiert und nach Bebrütung bei 30°C die Anzahl der atmungsdefekten und atmungskompetenten Kolonien ausgezählt und daraus der spontane ρ^- Anteil bestimmt.

Populationen der Mutanten $ccr-91$ und $ccr-94$ enthielten wie die Wildtypstämme 0,1% ρ^- Zellen. Die Populationen der Mutanten $ccr-92$ und $ccr-93$ dagegen zeigten 1-2% ρ^- Zellen. Letztere Mutationen scheinen demnach eine geringere Stabilität des mitochondrialen Genoms zu bedingen.

III. Biochemische Charakterisierung der konstitutiv dereprimierten Mutanten

Rotfärbung von Kolonien durch TTC, also dessen rasche Reduzierung zu Formazan durch Elektronen der Atmungskette, wurde bisher als einziges Kriterium zur Erkennung von ccr^- Mutanten verwendet. Als mögliche Ursachen für die beobachtete Rotfärbung können zunächst zwei durch die ccr^- Mutationen bedingte Veränderungen genannt werden:

1. Die Verwertung von Glukose in ccr^- Zellen ist stark eingeschränkt. Als Folge wird ein (hypothetischer) Katabolit nur in geringen Mengen gebildet, der nicht ausreicht um die beim Wildtyp auftretende Repression des cytoplasmatischen und mitochondrialen Systems erkennen zu lassen. Es wird erwartet, daß bei eingeschränkter Verwertung von Glukose die hohe Wachstumsgeschwindigkeit des Wildtyps nicht erreicht wird.

2. Ist die Verwertung von Glukose in den ccr^- Mutanten nicht eingeschränkt, tritt die für den Wildtyp bekannte Repression im cytoplasmatischen System bei gleichzeitigem raschen Zellwachstum ein. Eine Repression von Komponenten des mitochondrialen Bereichs bleibt jedoch aus, d.h. nur allein dieses System ist dem reprimierenden Einfluß von Glukose gegenüber "resistent".

Im folgenden soll an ccr^- Mutanten und am Wildtyp geprüft werden, inwieweit von der Katabolitrepression abhängige Funktionen des mitochondrialen und cytoplasmatischen Systems durch Glukose und andere vergärbare Substrate reprimierbar sind.

1. Wachstumscharakteristika

In Glyzerin- und Galaktosemedium wachsen ccr^- Mutanten und der Wildtyp normal. Die Verdopplung der Zellzahl beträgt in Glyzerin- 6 Stunden und in Galaktosemedium 4 Stunden (Abb. 2a bis 2e). Werden die Zellen in flüssigem Medium mit verschiedenen Glukosekonzentrationen (3%, 5%, 7,5%, 10% Glukose) gezüchtet, zeigen die Mutanten $ccr-92$, $ccr-93$ und $ccr-94$ (Abb. 2c bis 2e) die gleiche Wachstumsgeschwindigkeit von 3 Stunden pro Zellgeneration wie der Wildtyp (Abb. 2a).

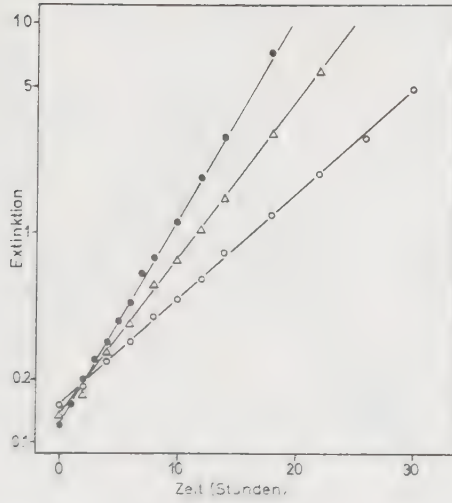
Die Mutante $ccr-91$ dagegen läßt eine kürzere Generationszeit (≈ 2 Stunden) in Glukosemedium bei allen Konzentrationen erkennen (Abb. 2b). Sie besitzt also dem Wildtyp und den anderen Mutanten gegenüber einen Wachstumsvorteil in Glukosemedium.

Dieses Ergebnis schließt aus, daß die ccr^- Mutanten in der Verwertung von vergärbaren Substraten wie Glukose und Galaktose als Kohlenstoffquelle im Wachstumsmedium deutlich eingeschränkt sind.

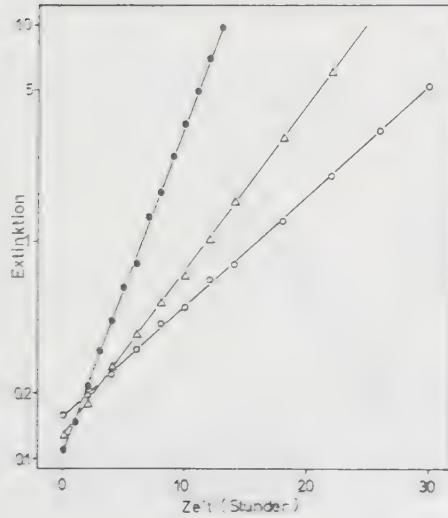
2. Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs und der CO_2 - Produktion

2.1. Sauerstoffverbrauch bei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen der Hefezellen

Dereprimierten Kulturen des Wildtyps und der ccr^- Mutanten wurden 7,5% Glukose oder 3% Galaktose zugesetzt. Eine Probe wuchs als Kontrolle in Glyzerinmedium. Jede Stunde wurde gleichzeitig der Sauerstoffverbrauch und das Wachstum der



Zeit



Zeit

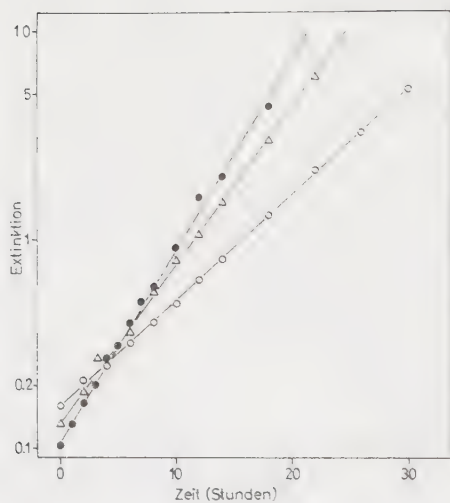


Abb. 20

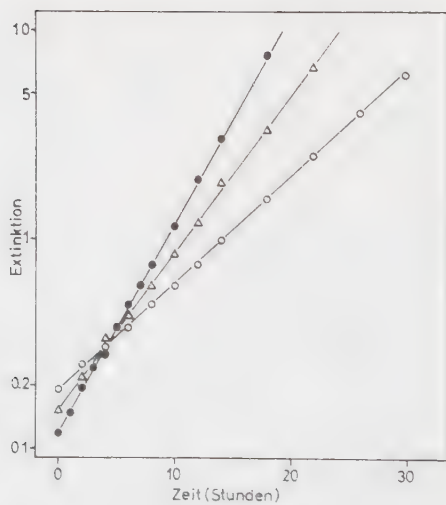


Abb. 21

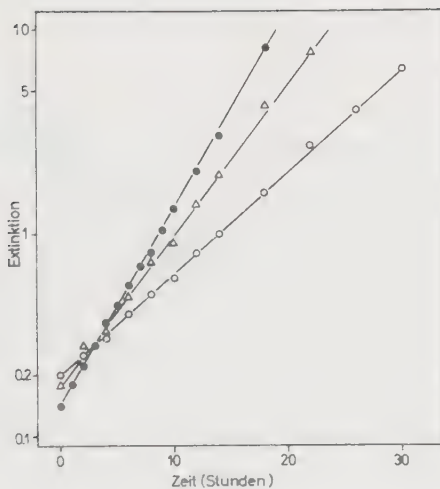


Abb. 2a

Abb. 2a bis 2e

Wachstumskurven des Wildtyps SM 11-6C und der ccr^- Mutanten in Glycerinmedium $\circ$ — $\circ$, in Galaktosemedium $\triangle$ — $\triangle$ und in Glukosemedium $\bullet$ — $\bullet$.

Das Wachstum der Zellen wurde zu verschiedenen Zeiten durch Messung der optischen Dichte in einem Eppendorf-Photometer bei einer Wellenlänge von 578 nm bestimmt.

Abb. 2a = Wildtyp

Abb. 2d = Mutante ccr -93

Abb. 2b = Mutante ccr -91

Abb. 2e = Mutante ccr -94

Abb. 2c = Mutante ccr -92

Zellen bestimmt. Die Atmungsaktivität war in allen Versuchen durch Zugabe von 10 μ l - 20 μ l KCN (1 mg / ml) hemmbar.

In Abb. 3 bis 7 sind die Ergebnisse des Sauerstoffverbrauchs von dereprimierten (Glycerin) im Vergleich zu reprimierten (Glukose oder Galaktose) Zellen der ccr^- Mutanten und des Wildtyps SM 11-6C dargestellt:

Während des Wachstums der ccr^- Mutanten und des Wildtyps in

Glyzerinmedium bleibt der Sauerstoffverbrauch konstant hoch (Abb. 3 bis 7).

Nach Zugabe von Glukose oder Galaktose zu dereprimierten Zellen des Wildtyps und der ccr^- Mutanten ist bis zur ersten Verdopplung der Zellen (2-3 Stunden in Glukosemedium; 4 Stunden in Galaktosemedium $\approx$ 1 Zellgeneration) keine Abnahme der Atmungsaktivität erkennbar (Abb. 3 bis 7).

Eine signifikante Reduzierung des Sauerstoffverbrauchs tritt beim Wildtyp erst während der zweiten Verdopplung der Zellzahl in vergärbaren Substraten auf. Bis zur dritten Zellverdopplung in Glukosemedium verringert sich die Atmungsaktivität um den Faktor 5, in Galaktose um den Faktor 2 (Abb. 3). Der Sauerstoffverbrauch bleibt dann im weiteren Wachstum der Zellen in vergärbaren Substraten konstant, die Wildtypzellen haben den vollständig reprimierten Zustand erreicht.

Die Mutante $ccr-91$ dagegen zeigt keine signifikanten Unterschiede im Sauerstoffverbrauch während des Wachstums der Zellen in vergärbaren Substraten im Vergleich zu in Glyzerinmedium gewachsenen Kulturen (Abb. 4). Die Atmungsaktivität dieser Mutante bleibt auch beim Wachstum über längere Zeit in Glukose- oder Galaktosemedium im Gegensatz zum Wildtyp konstant hoch.

Bei den Mutanten $ccr-92$ (Abb. 5) und $ccr-93$ (Abb. 6) ist bis zur dritten Zellverdopplung nach Zugabe von Glukose eine Abnahme des Sauerstoffverbrauchs um den Faktor 2 und bei der $ccr-94$ (Abb. 7) um den Faktor 1,5 zu beobachten. Die Atmungsaktivität bleibt im weiteren Wachstum der Zellen kon-

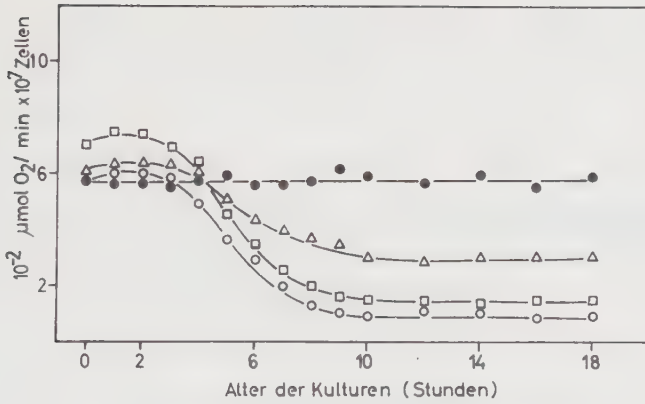


Abb. 3

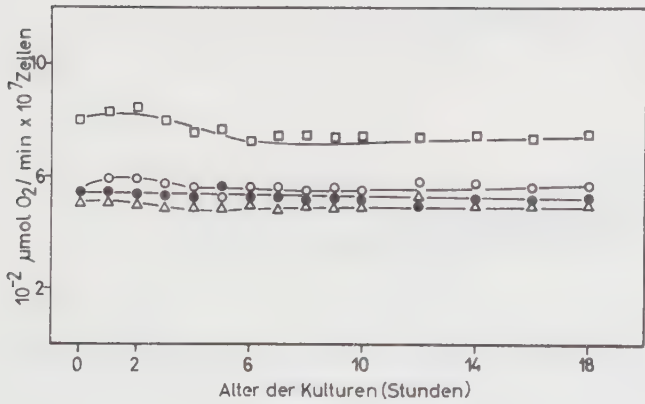


Abb. 4

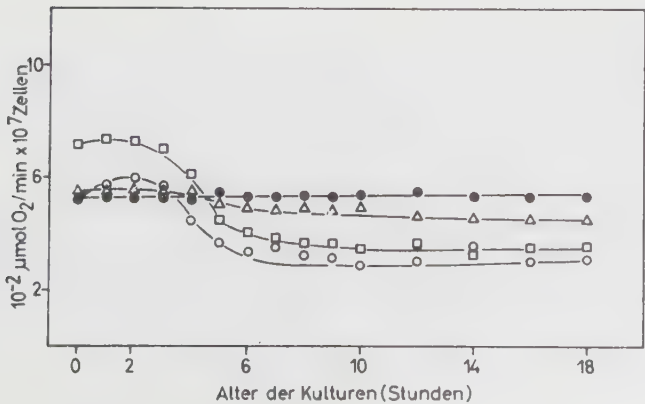


Abb. 5

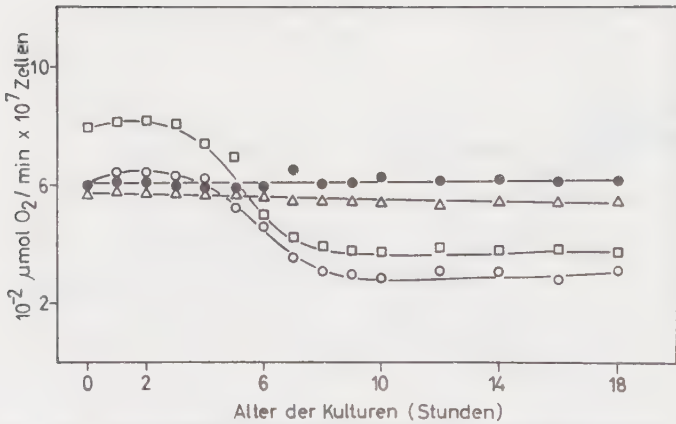


Abb. 6

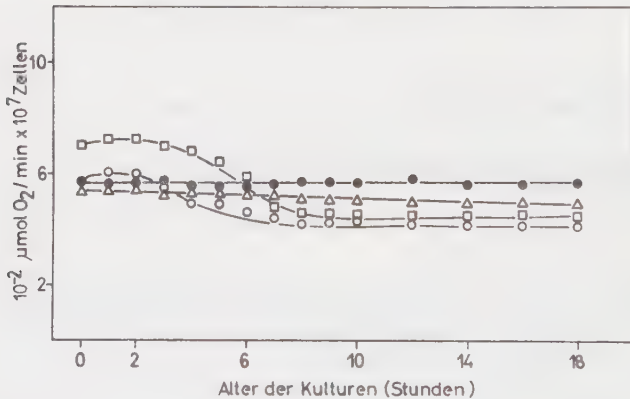


Abb. 7

Abb. 3 bis 7

Polarographische Messung des Sauerstoffverbrauchs ($\mu\text{mol O}_2 / \text{min} \times 10^7 \text{ Zellen}$) in einer Eschweiler Sauerstoffelektrode in Abhängigkeit zum Wachstum der Zellen in Glycerin (geschlossene Kreise), in Glukose (offene Kreise) und Galaktosemedium (offene Dreiecke); die Atmungsaktivität der diploiden Nachkommen $\text{ccr}^+ \times \text{ccr}^+$ und $\text{ccr}^+ \times \text{ccr}^-$ wurde während des Wachstums in Glukosemedium (offene Quadrate) dargestellt.

Abb. 3 = Wildtyp SM 11-60; Diploide aus der Kreuzung $\text{ccr}^+ \times \text{ccr}^+$
 Abb. 4 = Mutante ccr-91 ; Diploide aus der Kreuzung $\text{ccr}^+ \times \text{ccr-91}$
 Abb. 5 = Mutante ccr-92 ; Diploide aus der Kreuzung $\text{ccr}^+ \times \text{ccr-92}$
 Abb. 6 = Mutante ccr-93 ; Diploide aus der Kreuzung $\text{ccr}^+ \times \text{ccr-93}$
 Abb. 7 = Mutante ccr-94 ; Diploide aus der Kreuzung $\text{ccr}^+ \times \text{ccr-94}$

stant. Während der Züchtung in Galaktosemedium zeigt sich keine signifikante Reduzierung im Sauerstoffverbrauch im Vergleich zu dereprimierten Kulturen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Mutanten *ccr-92*, *ccr-93* und *ccr-94* im Vergleich zur Mutante *ccr-91* eine signifikante - im Gegensatz zum Wildtyp - aber nur eine sehr geringe Abnahme des Sauerstoffverbrauchs während der Glukoserepression zeigen. Eine vollständige "Resistenz" der Atmungsaktivität gegen die stark reprimierende Wirkung der Glukose ist nur bei der Mutante *ccr-91* zu beobachten. Dieses Ergebnis wird durch die folgenden Untersuchungen an den diploiden Nachkommen aus den Kreuzungen Wildtyp (*ccr*⁺) x *ccr*⁻ und *ccr*⁺ x *ccr*⁺ bestätigt:

Diploide Nachkommen aus der Kreuzung *ccr*⁺ x *ccr*⁺ zeigen - ähnlich haploiden Wildtypzellen - während der Glukoserepression eine Abnahme des Sauerstoffverbrauchs um den Faktor 5 (Abb.3).

Die Diploiden aus der Kreuzung *ccr*⁺ x *ccr-91* (Abb.4) dagegen lassen eine sehr geringe Repression der Atmungsaktivität erkennen.

Eine Verringerung des Sauerstoffverbrauchs um den Faktor 1,5 - 2 ist bei den Diploiden aus den Kreuzungen *ccr*⁺ x *ccr-92* (Abb.5), *ccr*⁺ x *ccr-93* (Abb.6) und *ccr*⁺ x *ccr-94* (Abb.7) zu beobachten.

Alle diploiden Nachkommen aus den Kreuzungen *ccr*⁺ x *ccr*⁻ zeigen eine sehr viel geringere Repression des Sauerstoffverbrauchs durch Glukose im Vergleich zu denen aus der Kreuzung *ccr*⁺ x *ccr*⁺. Daraus kann geschlossen werden, daß die *ccr*⁻ Mutation(en) dominant ist (sind) (vgl. Kapitel II.1.).

2.2. CO₂ - Produktion während der Glukosefermentation

Bei der Hefe Saccharomyces cerevisiae ist die Art der Glukoseverwertung abhängig von der Konzentration der Glukose im Wachstumsmedium. Steigende Glukosekonzentrationen ($> 6 \times 10^{-3} \text{M}$) stimulieren die glykolytische Aktivität und reduzieren die oxidative Energiegewinnung durch Hemmung von Enzymsynthesen der Atmungskette (Beck und von Meyenburg, 1966 ; de Deken, 1966 ; Sols et al., 1971) Die Zunahme der Fermentation (CO₂ - Produktion), die mit einem höheren Umsatz an Glukose verbunden ist, und die Abnahme der Atmungsaktivität wird als "Crabtree effect" bezeichnet (de Deken, 1966).

In einem Warburg-Apparat wurde gleichzeitig die CO₂-Produktion (Abb.8a) und der Sauerstoffverbrauch (Abb.8b) nach Zugabe von Glukose zu dereprimierten Kulturen der Mutanten ccr-91 und ccr-94 im Vergleich zum Wildtyp manometrisch gemessen. Die CO₂-Werte ($\mu\text{mol CO}_2/\text{min} \times 10^7$ Zellen) und O₂-Werte ($\mu\text{mol O}_2/\text{min} \times 10^7$ Zellen) wurden in Abhängigkeit vom Wachstum der Zellen in Glukosemedium dargestellt.

Nach Zugabe von Glukose zu dereprimierten Kulturen tritt eine sofortige, starke Zunahme der CO₂-Produktion beim Wildtyp wie bei der Mutante ccr-91 auf. Bei der Mutante ccr-94 nimmt die CO₂-Produktion langsamer zu und ihr maximaler Wert ist im Vergleich zum Wildtyp um den Faktor 1,6 geringer.

Nach 4 Stunden Wachstum der Zellen in Glukosemedium ist keine weitere Zunahme der CO₂-Produktion zu beobachten. Die CO₂-Produktion bleibt im weiteren Wachstum der Kulturen in Glukose konstant.

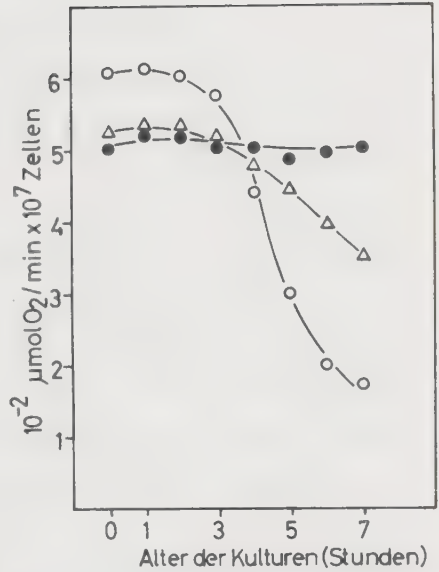
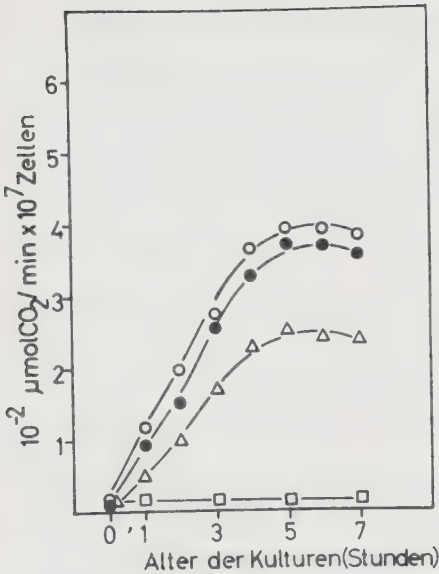


Abb. 8a

Abb. 8b

Abb. 8a

Manometrische Messung der CO_2 -Produktion ($\mu\text{mol CO}_2/\text{min} \times 10^7$ Zellen) im Warburg-Apparat beim Wildtyp $\circ$ — $\circ$, bei der Mutante ccr-91 $\bullet$ — $\bullet$ und ccr-94 $\triangle$ — $\triangle$ während des Wachstums der Zellen in Glukosemedium und in Glyzerinmedium als Kontrolle $\square$ — $\square$.

Abb. 8b

Manometrische Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs ($\mu\text{mol O}_2/\text{min} \times 10^7$ Zellen), der gleichzeitig mit der CO_2 -Produktion im Warburg-Apparat beim Wildtyp SM 11-6C $\circ$ — $\circ$, bei der Mutante ccr-91 $\bullet$ — $\bullet$ und ccr-94 $\triangle$ — $\triangle$ während des Wachstums der Zellen in Glukosemedium gemessen wurde.

Im Gegensatz dazu beobachtete Ciriacy (1977, 1978) bei der "Glukose-resistenten" Mutante ccr-80 (isoliert aus einem ADH^- Stamm der Bäckerhefe) eine sofortige, starke Zunahme der CO_2 -Produktion nach Zugabe von Glukose, die aber schon nach

einer Stunde beendet wird und im folgenden Wachstum der Mutante konstant auf niedrigem Niveau bleibt, während Wildtypzellen die gleiche Kinetik der CO_2 -Produktion erkennen lassen wie die hier untersuchten ccr^- Mutanten und der Wildtyp SM 11-6C.

Die sofortige Zunahme der CO_2 -Produktion nach Zugabe von Glukose zu dereprimierten Wildtypzellen entspricht den von Beck und Meyenburg (1966) und de Deken (1966) beschriebenen Untersuchungen. Wie die in Abbildung 8a dargestellten Ergebnisse zeigen, steigt die CO_2 -Produktion während der ersten drei Stunden um das 15 fache im Vergleich zur Kontrolle (Glyzerin) an und bleibt dann konstant hoch. Der Sauerstoffverbrauch beim Wildtyp (Abb.8b) nimmt erst nach drei Stunden (≈ 1 Zellverdopplung) Wachstum in Glukosemedium sehr stark ab (vgl. Kapitel III 2.1., Abb.3). Die Mutanten ccr-91 und ccr-94 (Abb.8a) verhalten sich in der CO_2 -Produktion wie der Wildtyp. Im Gegensatz zum Wildtyp zeigen sie keine oder eine geringere Abnahme des Sauerstoffverbrauchs (Abb. 8b, Kapitel III 2.1., Abb.4 und 7).

Dieses Ergebnis schließt eine Beeinflussung der aeroben Glukose-Fermentation durch die ccr^- Mutation aus, und weist im wesentlichen auf eine unveränderte Aktivität und Stimulierbarkeit des gesamten glykolytischen Abbaus bei der Mutante ccr-91 hin. Außerdem zeigt sich hier eine Übereinstimmung mit den im Vergleich zum Wildtyp unveränderten Wachstumseigenschaften der Mutante ccr-91 (vgl. Abb.2a und 2b) in vergärbaren Substraten.

3. Wachstum und Sauerstoffverbrauch der Hefezellen nach Zugabe von D-Glucosamin zum Wachstumsmedium

Das Glukose analoge Substrat D-Glucosamin bewirkt bei Hefen eine ähnliche Repression des Sauerstoffverbrauchs und der Cytochrom-c-Oxidase wie Glukose und hemmt das Wachstum der Zellen in Glyzerin- und in Äthanolmedium (Elliot und Ball, 1973, 1975; Furst und Michels, 1977).

Elliot und Ball (1973) beobachteten Glucosamin-resistente Mutanten bei der Hefe Saccharomyces cerevisiae, die durch Glukose nicht reprimierbar waren. Daher sollte die Wirkung von Glucosamin bei den ccr^- Mutanten im Vergleich zum Wildtyp auf das Wachstum der Zellen in Glyzerinmedium und auf den Sauerstoffverbrauch untersucht werden.

3.1. Wachstum der ccr^- Mutanten und des Wildtyps in Glyzerinmedium mit D-Glucosamin

Das Wachstum der ccr^- Mutanten und des Wildtyps wurde nach Zugabe von verschiedenen Glucosaminkonzentrationen (100 µg/ml, 200 µg/ml, 350 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml) zum Glyzerinmedium durch Messung der optischen Dichte in einem Eppendorf-Photometer bestimmt. Als Kontrolle wuchs jeweils eine Zellkultur nur in Glyzerinmedium.

In Abb. 9 sind die Wachstumskurven der Mutante $ccr-91$ und des Wildtyps dargestellt:

Zugabe von D-Glucosamin (500 µg/ml) bedingt beim Wildtyp zuerst eine Verlangsamung und nach vier Stunden eine Hemmung des Wachstums in Glyzerinmedium (Abb.9). Geringere Glucosaminkonzentrationen verursachen keine Veränderungen in der

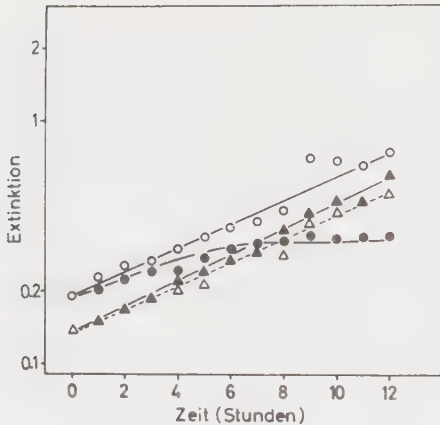


Abb. 9

Wachstum des Wildtyps und der Mutante ccr-91 wurde zu verschiedenen Zeiten durch Messung der optischen Dichte in einem Eppendorf-Photometer bei einer Wellenlänge von 578 nm bestimmt.

- Wildtyp in Glyzerinmedium
- Wildtyp in Glyzerinmedium + D-Glucosamin (500µg/ml)
- △—△ Mutante ccr-91 in Glyzerinmedium
- ▲—▲ Mutante ccr-91 in Glyzerinmedium + D-Glucosamin

Wachstumsgeschwindigkeit der Wildtypzellen in Glyzerinmedium.

Die Mutante ccr-91 läßt ein normales Wachstum nach Zugabe von Glucosamin im Vergleich zur Kontrolle in Glyzerinmedium erkennen (Abb.9). Die hier nicht dargestellten Mutanten ccr-92, ccr-93 und ccr-94 zeigen wie die Mutante ccr-91 keine Hemmung des Zellwachstums in Glyzerinmedium durch Glucosamin.

3.2. Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs während des Wachstums der Hefezellen in D-Glucosamin-Medium

Dereprimierten Kulturen des Wildtyps und der Mutante ccr-91 wurde Glucosamin (200 µg/ml), 7,5% Glukose, 3% Galaktose oder 3% Galaktose + Glucosamin (200 µg/ml) zugesetzt und eine Probe wuchs in Glyzerinmedium weiter. Bei der hier gewählten Glucosaminkonzentration trat beim Wildtyp keine Hemmung des Zellwachstums in Glyzerinmedium auf.

Der Sauerstoffverbrauch des Wildtyps ist in Abb.10a und der Mutante ccr-91 in Abb.10b in Abhängigkeit zum Zellwachstum dargestellt:

Nach Zugabe von Glucosamin zeigen Wildtypzellen erst nach einer Verdopplung der Zellzahl (≈3Stunden) eine signifikante Abnahme der Atmungsaktivität und bis zur dritten Zellverdopplung eine Verringerung um den Faktor 5. Die Reduzierung des Sauerstoffverbrauchs beim Wildtyp durch Glucosamin läßt eine ähnliche Kinetik wie nach Zugabe von Glukose zu dereprimierten Kulturen erkennen (vgl.Kapitel III 2.1., Abb.3). Galaktose bewirkt im Vergleich zu Glukose eine geringere Repression der Atmungsaktivität; wird aber zur Galaktose noch Glucosamin zugesetzt, tritt eine ähnlich starke Abnahme des Sauerstoffverbrauchs beim Wildtyp wie nach Zugabe von Glukose auf (Abb.10a).

Bei der Mutante ccr-91 sind keine signifikanten Veränderungen des Sauerstoffverbrauchs während des Wachstums der Zellen in Glukosemedium und nach Zugabe von Glucosamin zum Glyzerinmedium zu beobachten (Abb.10b). Die Mutante

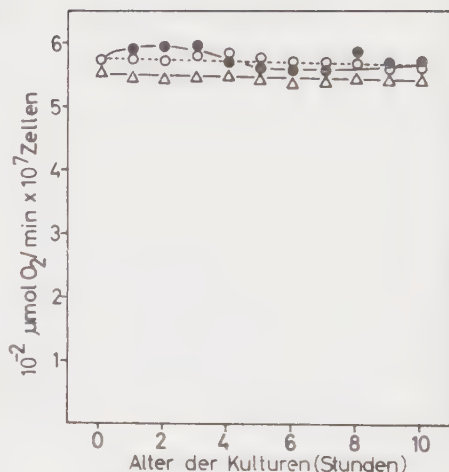
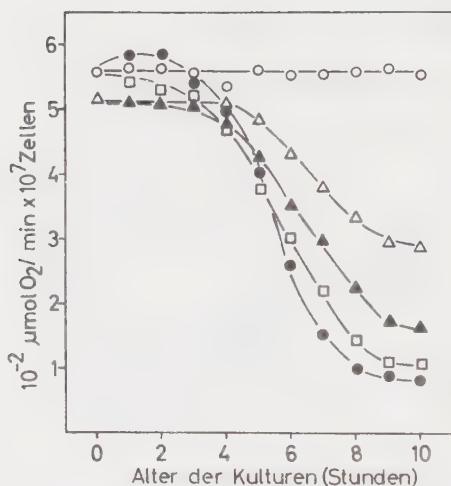


Abb. 10a

Abb. 10b

Der Sauerstoffverbrauch des Wildtyps SM 11-6C und der Mutante ccr-91 wurde polarographisch mit einer Eschweiler-Sauerstoffelektrode ($\mu\text{mol O}_2/\text{min} \times 10^7$ Zellen) in Abhängigkeit zum Wachstum der Hefezellen bestimmt.

Abb. 10a = Wildtyp in Glyzerin $\bigcirc$ — $\bigcirc$, in Glyzerin + Glucosamin (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) $\square$ — $\square$, in Glukose $\bullet$ — $\bullet$, in Galaktose $\triangle$ — $\triangle$, in Galaktose + Glucosamin (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$

Abb. 10b = Mutante ccr-91 in Glyzerin und in Glyzerin + Glucosamin (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) $\bigcirc$ — $\bigcirc$, in Glukose $\bullet$ — $\bullet$, in Galaktose $\triangle$ — $\triangle$ und Galaktose + Glucosamin $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$

ccr-91 zeigt keine Reduzierung der Atmungsaktivität, sie verhält sich sowohl Glukose wie auch Glucosamin gegenüber "resistent".

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß D-Glucosamin, ein Glukose analoges Substrat, bei den ccr⁻ Mutanten - im Gegensatz zum Wildtyp - keine Hemmung des Zellwachstums in Glyzerinmedium und keine Repression des Sauerstoffverbrauchs bewirkt. Beim Wildtyp läuft die Repression der Atmungsakti-

vität durch Glukosamin ähnlich wie nach Zugabe von Glukose zu dereprimierten Zellen ab. Die hier beobachtete "Glucosamin-Resistenz" der ccr^- Mutanten wird in den weiteren Untersuchungen nicht berücksichtigt, da die Tetradenanalyse nach Meiose und Sporulation der diploiden Nachkommen aus der Kreuzung Wildtyp x $ccr-91$ keine klare 2 : 2 Aufspaltung in Glucosamin-resistente : Glucosamin-sensible Sporenphänotypen zeigt. Die "Glucosamin-Resistenz" wird relativ häufig nicht zusammen mit der ccr^- Mutation vererbt. Dieses Ergebnis kann mit der Benutzung von nicht isogenischen Stämmen in der Kreuzung erklärt werden.

4. Anwendung der DAPI-Fluoreszenzmethode zur Bestimmung der Anzahl fluoreszierender, cytoplasmatischer Strukturen in der Hefezelle

Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Jayaraman et al. (1966), Stevens (1974) und Williamson (1976) zeigten, daß nach Wachstum der Hefezellen in vergärbaren Substraten im Vergleich zu in Glyzerin gewachsenen Kulturen eine reduzierte Anzahl und eine veränderte Morphologie ihrer Mitochondrien erkennbar war. Williamson und Fennell (1975) untersuchten mit Hilfe des fluoreszierenden Farbstoffs 4',6-diamidino-2-Phenylindol (DAPI), der sich spezifisch an die DNS anlagert, dereprimierte Wildtypzellen und "petite" Mutanten ohne jegliche mitochondriale DNS (ρ^0). Im mikroskopischen Bild zeigte sich in den Wildtypzellen wie in den "petite" Mutanten ein großer, fluoreszierender

Körper, der Kern. Aber nur in den Wildtypzellen konnten noch zahlreiche fluoreszierende, cytoplasmatische Strukturen beobachtet werden, die in ρ^0 Zellen vollständig fehlten. Da diese schmalen, extranuklearen Körper nur in Zellen nachweisbar sind, die mitDNS enthalten, handelt es sich um mitDNS-Moleküle, die wahrscheinlich als größere Aggregate vorliegen (Williamson und Fennell, 1975; Williamson, 1976).

Mit der DAPI-Fluoreszenzmethode bietet sich eine Möglichkeit, die Anzahl der fluoreszierenden, cytoplasmatischen Strukturen in der Hefezelle in Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle zu bestimmen. Die Anzahl der Strukturen pro Zelle wurde bei den ccr^- Mutanten im Vergleich zum Wildtyp während des Wachstums in Glukose- und Glyzerinmedium am Fluoreszenzmikroskop bestimmt und in Tabelle 4 dargestellt.

Beim Wildtyp zeigt sich eine signifikante Reduzierung in der Anzahl der fluoreszierenden, cytoplasmatischen Strukturen wie in der Atmungsaktivität erst während der zweiten Zellverdopplung in Glukosemedium und nimmt bis zur 5. Zellverdopplung um den Faktor 5 ab. In Glyzerinmedium gewachsene Wildtypzellen lassen eine konstante Anzahl dieser Strukturen erkennen. Die starke Abnahme beim Wildtyp während der Repression zeigt deutlich eine Abhängigkeit der Anzahl cytoplasmatischer Strukturen von der Kohlenstoffquelle im Wachstumsmedium. Die hier beobachteten Befunde beim Wildtyp zusammen mit der Übereinstimmung zwischen dem mitochondrialen DNS-Gehalt relativ zur Kern-DNS (Bleeg et al., 1972; vgl. Kapitel III 7.2.) und der Anzahl von mitDNS-Molekülen (Stevens, 1974) stützt die Schlußfolgerung

Stamm	Wachstums- bedingun- gen	Anzahl der fluoreszierenden, cytoplas- matischen Strukturen/Zelle					
		Anzahl der Zellverdopplungen					
		0	1	2	3	4	5
SM 11-6C	reprimiert	24	22	15	6	5	5
SM 11-6C	dereprimiert	24	23	25	25	23	24
	Q	1	1	0,6	0,2	0,2	0,2
ccr-91	reprimiert	23	22	24	23	22	22
ccr-91	dereprimiert	23	23	24	23	22	23
	Q	1	1	1	1	1	1
ccr-92	reprimiert	20	20	18	15	13	13
ccr-92	dereprimiert	20	20	21	20	20	19
	Q	1	1	0,9	0,8	0,7	0,7
ccr-93	reprimiert	20	18	16	14	13	13
ccr-93	dereprimiert	21	20	19	20	21	21
	Q	1	0,9	0,8	0,7	0,6	0,6
ccr-94	reprimiert	20	21	20	18	17	17
ccr-94	dereprimiert	20	21	21	21	20	20
	Q	1	1	1	0,9	0,8	0,8

Tabelle 4: Mittlere Anzahl fluoreszierender, cytoplasmatischer Strukturen/Zelle.

Dereprimierten Zellkulturen wurde 7,5% Glukose zugesetzt, als Kontrolle diente jeweils eine Glyzerinkultur. Nach jeder Verdopplung der dereprimierten (Glyzerin) und reprimierten (Glukose) Zellen wurde mit Hilfe der DAPI-Fluoreszenzmethode nach Williamson und Fennell (1975) die Anzahl der fluoreszierenden, cytoplasmatischen Strukturen am Fluoreszenzmikroskop bestimmt.

Q = Quotient von reprimierten zu dereprimierten Kulturen

von Williamson und Fennell (1975), daß die im Wildtyp erkennbaren schmalen, extranuklearen Körper aus mitDNS-Molekülen bestehen.

Nach 4-5 Zellverdopplungen der Mutanten *ccr-92* und *ccr-93* in Glukosemedium nimmt die Anzahl der cytoplasmatischen Strukturen um den Faktor 1,6 ab und bei der Mutante *ccr-94* um den Faktor 1,2. Im Vergleich zum Wildtyp zeigen diese Mutanten eine sehr geringe Repression während des Wachstums in Glukosemedium.

Im Gegensatz dazu ist bei der Mutante *ccr-91* die gleiche Anzahl fluoreszierender, cytoplasmatischer Strukturen nach Wachstum in Glukose- wie in Glyzerinmedium zu beobachten. Die Mutante *ccr-91* verhält sich vollständig "dereprimiert", d.h. die Anwesenheit von Glukose im Wachstumsmedium führt zu keiner signifikanten Repression in der Anzahl der cytoplasmatischen Strukturen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß mit der DAPI-Fluoreszenzmethode Unterschiede in der Anzahl der fluoreszierenden, cytoplasmatischen Strukturen beim Übergang der Hefezellen vom dereprimierten in den reprimierten Zustand gut nachgewiesen werden können. Die Anzahl dieser Strukturen in den Hefezellen gibt einen Hinweis auf den mitDNS Gehalt.

5. Tieftemperatur-Spektroskopie an ganzen Zellen

In den Abbildungen 11 bis 15 sind die Differenzspektren der Cytochrome der *ccr*⁻ Mutanten und des Wildtyps im dereprimierten und reprimierten Zustand dargestellt. Wie erwartet, zeigt der Wildtyp nach Wachstum in vergärbaren Substraten die typischen Veränderungen im Gehalt der Cytochrome, die schon von Jayaraman et al. (1966), Bleeg et al. (1972) und Perlman und Mahler (1974) beschrieben wurden:

Glukose als Kohlenstoffquelle im Wachstumsmedium führt bei Wildtypzellen (Abb.11) zu einem vollständigen Fehlen des Cytochroms aa₃ (600 nm) und zu einer starken Reduktion des Cytochroms b (558 nm), Cytochroms c₁ (554 nm) und Cytochroms c (547 nm) im Vergleich zu dereprimierten Kulturen. Galaktose dagegen bedingt nicht den vollständigen Verlust des Cytochroms aa₃, und die Zellen zeigen eine geringere Abnahme im Gehalt der anderen Cytochrome als nach Wachstum in Glukosemedium.

Im Gegensatz zum Wildtyp läßt die Mutante ccr-91 (Abb.12) nach Wachstum in vergärbaren Substraten das gleiche Differenzspektrum der Cytochrome wie nach Wachstum in Glyzerinmedium erkennen. Der Cytochromgehalt bleibt auch dann konstant hoch, wenn die Mutante über längere Zeit ($\approx$ 20 Zellverdopplungen, hier nicht dargestellt) in vergärbaren Substraten gezüchtet wird.

Die Mutanten ccr-92 (Abb.13) und ccr-93 (Abb.14) zeigen nach Wachstum in Glukosemedium eine geringere Abnahme im Cytochromgehalt als der reprimierte Wildtyp. Im Vergleich zu dereprimierten Kulturen ist diese Repression signifikant. Nach Züchtung der Mutanten in Galaktosemedium ist keine Reduzierung der Cytochrome zu beobachten.

Wachstum in Glukosemedium führt bei der Mutante ccr-94 (Abb.15) nur zu einer geringen Abnahme des Cytochroms aa₃. Der Cytochromgehalt zeigt keine Veränderungen nach Wachstum der Zellen in Galaktosemedium.

Die hier dargestellten Ergebnisse lassen eine gute Übereinstimmung zwischen dem Cytochromgehalt der Zellen und der

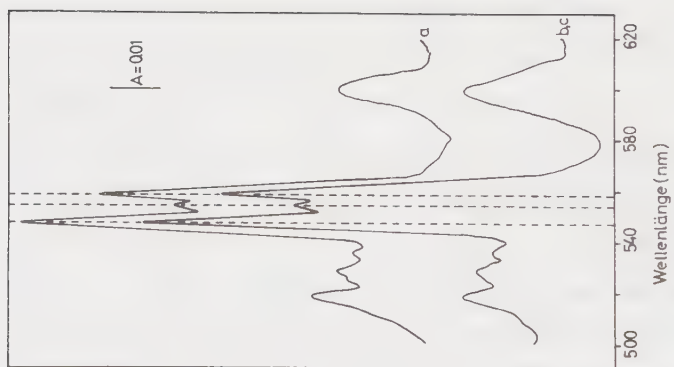


Abb. 12

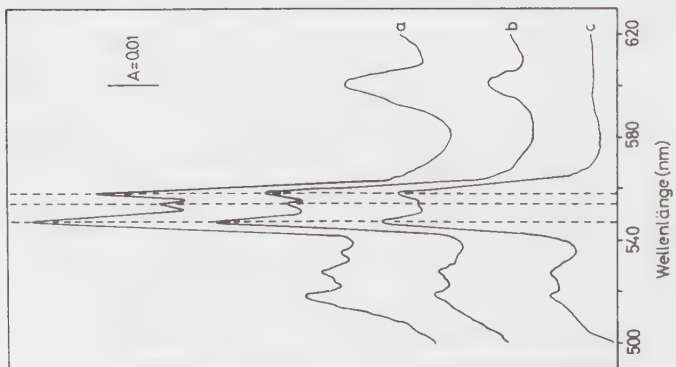


Abb. 11



Abb. 13

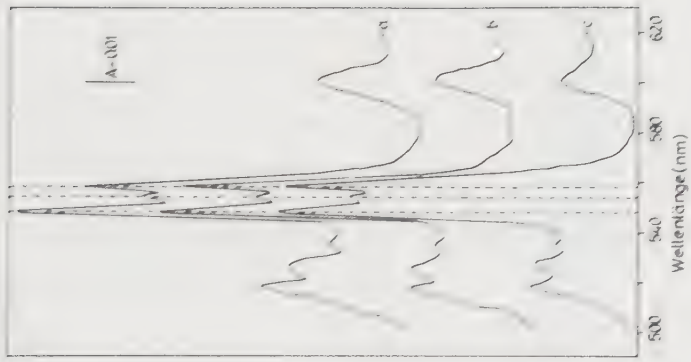


Abb. 14

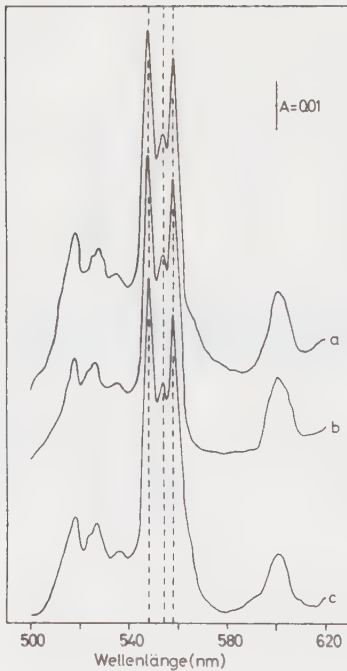


Abb. 15

Abb.11 bis 15

Differenzspektren der Cytochrome an ganzen Zellen des Wildtyps und der ccr^- Mutanten wurden in einem Zweistrahlsspektrophotometer (Shimadzu) bei 77°K und einer Wellenlänge von 620-500 nm nach Wachstum der Zellen in Glyzerin- (Kurve a), in Galaktose- (Kurve b) und in Glukosemedium (Kurve c) aufgezeichnet. Die gestrichelten Linien zeigen das Absorptionsmaximum der Cytochrome c (547 nm), c_1 (554 nm) und b (558 nm).

Abb.11 = Wildtyp SM 11-6C

Abb.12 = Mutante $ccr-91$

Abb.13 = Mutante $ccr-92$

Abb.14 = Mutante $ccr-93$

Abb.15 = Mutante $ccr-94$

Kinetik des Sauerstoffverbrauchs nach Wachstum der ccr^- Mutanten und des Wildtyps in vergärbaren Substraten erkennen. Alle vier ccr^- Mutanten zeigen nach Züchtung in Galaktosemedium im Vergleich zu dereprimierten Kulturen keine Ab-

nahme im Sauerstoffverbrauch und im Cytochromgehalt. Glukose dagegen führt bei den Mutanten *ccr-92*, *ccr-93* und *ccr-94* zu einer Reduzierung um den Faktor 1,5 bis 2 in der Atmungsaktivität und im Cytochromgehalt. Die Mutante *ccr-91* verhält sich als einzige der untersuchten *ccr*⁻ Mutanten konstitutiv dereprimiert nach Wachstum in Glukosemedium, d.h. sie zeigt keine Repression im Sauerstoffverbrauch und im Cytochromgehalt. Sie entspricht also optimal dem gesuchten Mutantentyp.

6. Wirkung der Katabolitrepression auf cytoplasmatische und mitochondriale Enzymaktivitäten

In den folgenden Experimenten wurde der Einfluß von vergärbaren Substraten im Wachstumsmedium auf die Aktivitäten der Enzyme Maltase, Malatsynthase, Malatdehydrogenase (MDH) und Succinat-Cytochrom-c-Oxido-Reduktase (SDH) bei den *ccr*⁻ Mutanten und beim Wildtyp im Vergleich zu dereprimierten Kulturen untersucht. Es ist bekannt, daß Glukose oder Galaktose als Kohlenstoffquelle im Wachstumsmedium bei Hefezellen eine Repression von Enzymsynthesen und eine Inaktivierung von vorhandenen Enzymen bedingt (Polakis und Bartley, 1965; Witt et al., 1966; Duntze et al., 1969; Zimmermann und Eaton, 1974; Holzer, 1976).

Die in Tabelle 5 zusammengefaßten Ergebnisse zeigen, daß die Aktivitäten der cytoplasmatischen Enzyme Maltase und Malatsynthase im Wildtyp wie in den *ccr*⁻ Mutanten nach Wachstum in vergärbaren Substraten um den gleichen Faktor reduziert werden.

Succinat-Cytochrom-c-Oxido-Reduktase (SDH), ein Teil der an die Mitochondrienmembran gebundene Atmungskette,

Stamm	Wachstums- bedingung	Maltase	Malat- synthase	MDH	SDH
SM 11-6C	Glyzerin	145	493	7938	78
	Galaktose	81	28	3620	29
	Glukose	0,6	8	1550	6
ccr - 91	Glyzerin	170	476	8130	86
	Galaktose	93	24	5960	87
	Glukose	1,5	12	4310	84
ccr - 92	Glyzerin	96	454	8220	75
	Galaktose	58	16	6012	70
	Glukose	0,9	10	3870	54
ccr - 93	Glyzerin	104	463	7986	83
	Galaktose	66	27	5460	76
	Glukose	1,2	16	3486	60
ccr - 94	Glyzerin	93	486	8120	74
	Galaktose	54	29	5796	72
	Glukose	1,8	15	3620	69
ccr - 91 x Wildtyp	Glyzerin	136	526	7230	76
	Galaktose	79	35	4720	59
	Glukose	2,3	26	2979	50

Tabelle 5 : Bestimmung der spezifischen Aktivität von cytoplasmatischen und mitochondrialen Enzymen.

Kulturen der ccr⁻ Mutanten und des Wildtyps wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase in Glyzerin-, Galaktose- oder Glukosemedium gezüchtet. Die Aktivität der Enzyme Maltase, Malatsynthase, Malatdehydrogenase (MDH) und Succinat-Cytochrom-c-Oxido-Reduktase (SDH) wurde nach den beschriebenen Methoden (vgl. Kapitel, Material und Methoden 6.8.) bestimmt und in nmol/minxmg Protein angegeben.

wird in ihrer Aktivität beim Wildtyp nach Wachstum in Glukose- oder Galaktosemedium stark reduziert (Polakis et al., 1965).

Die ccr⁻ Mutanten dagegen lassen keine Veränderungen in der Aktivität des Enzyms SDH durch Galaktose erkennen. Wachstum der Mutanten ccr-92, ccr-93 und ccr-94 in Glukosemedium

führt zu einer Repression dieser Enzymaktivität, die aber sehr viel geringer ist als beim Wildtyp.

Nach Wachstum der Mutante *ccr-91* in Glukose- oder Galaktose-medium ist die gleiche Aktivität des Enzyms SDH im Vergleich zu dereprimierten Kulturen zu beobachten. Dieses Ergebnis zeigt gute Übereinstimmung mit den schon beschriebenen Untersuchungen des Sauerstoffverbrauchs und des Cytochromgehalts, die in der Mutante *ccr-91* nicht durch vergärbare Substrate reprimierbar waren.

Die Aktivität des Enzyms Malatdehydrogenase (MDH) zeigt beim Wildtyp nach Wachstum in vergärbaren Substraten eine Reduktion um den Faktor 5.

Bei allen *ccr*⁻ Mutanten ist eine geringe Repression der MDH-Aktivität zu beobachten, die damit erklärt werden kann, daß dieses Enzym aus zwei cytoplasmatischen und einem mitochondrialen Isoenzym besteht (Atzpodien et al., 1969). Da eines der cytoplasmatischen Isoenzyme durch Glukose inaktiviert wird (Holzer, 1976), erscheint in allen *ccr*⁻ Mutanten eine Reduzierung der MDH-Aktivität um den Faktor 1,5 bis 2.

Diploide Nachkommen aus der Kreuzung *ccr-91* x Wildtyp zeigen eine ähnliche Abnahme der cytoplasmatischen Enzymaktivität (Maltase und Malatsynthase) wie haploide Wildtypzellen nach Wachstum in vergärbaren Substraten. Eine geringere Abnahme als bei den haploiden Wildtypzellen zeigen die Diploiden in den Aktivitäten der Enzyme SDH und MDH, damit wird die Dominanz der *ccr*⁻ Mutation bestätigt.

7. Wirkung der Glukose-Repression auf den Einbau von markierten Aminosäuren in mitochondriale Proteine

7.1. Nachweis mitochondrialer Proteinsynthese

Die Differenzierung zwischen cytoplasmatischer und mitochondrialer Proteinsynthese beruht auf der unterschiedlichen Wirkung der verwendeten Antibiotika Cycloheximid (CHX) und Erythromycin (ERY). Wird Cycloheximid (100 µg/ml) drei Minuten vor Beginn der Markierung ganzer Zellen mit ^3H -Leucin zugegeben, blockiert es spezifisch die cytoplasmatische Proteinsynthese (Siegel und Sisler, 1967), d.h. die Proteinsynthese an den 80S-Ribosomen wird zu 99% gehemmt (Schweyen und Kaudewitz, 1971). Die 70S-Ribosomen der Mitochondrien dagegen verhalten sich gegenüber den Antibiotika Erythromycin und Chloramphenicol, bekannte Hemmstoffe der bakteriellen 70S-Ribosomen, sensibel (Lamb et al., 1968; Kutzleb et al., 1973). Der CHX-resistente Einbau von markiertem Leucin wird durch Zugabe von Erythromycin (4 mg/ml) zehn Minuten vor Beginn der Markierung zu mehr als 90% gehemmt.

In den folgenden Experimenten wird als mitochondriale Proteinsynthese der CHX-resistente, ERY-sensible Einbau markierter Aminosäuren in Prozent der gesamten Proteinsynthese in Abwesenheit von Hemmstoffen bezeichnet.

7.2. Veränderungen der mitochondrialen Proteinsynthese während der Repression

Durch Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen (Henson et al., 1968 ; Schweyen, 1971 ; Ibrahim et al., 1973) ist bekannt , daß die Synthese mitochondrialer Proteine bei

der Bäckerhefe der Glukoserepression unterliegt . Züchtung von Hefezellen in vergärbaren Substraten führt zu einer geringeren Einbaurrate markierter Aminosäuren durch die mitochondriale Proteinsynthese im Vergleich zu in Glycerin gewachsenen Zellen.

Die Kinetik der Repression der mitochondrialen Proteinsynthese vom dereprimierten zum reprimierten Zustand der Wildtypzellen und der ccr^- Mutanten ist in der Abbildung 16 und 17 dargestellt. Dafür wurden Zellen, gewachsen in Glukose-, Galaktose- oder Glycerinmedium, zu bestimmten Zeiten in Abwesenheit der Antibiotika, in Gegenwart von CHX und in Gegenwart von CHX und ERY mit markiertem Leucin inkubiert.

In Tabelle 6 ist die Gesamtinkorporation in Abwesenheit der Antibiotika und der Einbau von 3H -Leucin durch das mitochondriale Proteinsynthesystem der untersuchten Stämme zusammengefaßt:

Dereprimierte Kulturen des Wildtyps und der ccr^- Mutanten zeigen einen CHX-resistenten, ERY-sensiblen Einbau von 5,2% bis 6,8% der Gesamtinkorporation von 3H -Leucin. Dieser Syntheseanteil wird als mitochondrialer Anteil an der Gesamtproteinsynthese der Zellen bezeichnet.

Bereits eine Stunde nach Zugabe von Glukose zu dereprimierten Wildtypzellen tritt eine Reduzierung der mitochondrialen Proteinsynthese um den Faktor 3 auf. Dagegen ist aber eine Steigerung der absoluten Inkorporation von 3H -Leucin durch das cytoplasmatische um den Faktor 5 und eine vorübergehende durch das mitochondriale System um den Faktor 1,8 (Ta-

Stamm	Wachstum der Kulturen in Glukose-(a,b) oder Galaktosemedium (c,d)										Kontrolle				
	1 Stunde	2 Stunden	3 Stunden	4 Stunden	5 Stunden	6 Stunden					Glycerin	%			
	Ipm	Ipm	Ipm	Ipm	Ipm	Ipm					Ipm	%			
SM 11-6C	a	49000	2,1	38060	1,2	30000	1,0	24000	0,8	21880	0,6	19000	0,6	9800	6,0
	b	1030		456		300		190		175		115		588	
	c	30000	4,5	30600	4,0	25440	3,5	19790	3,0	15430	2,6	11200	2,5		
	d	1350		1224		890		590		400		280			
ccr - 91	a	62000	6,3	60800	6,2	62000	6,3	61760	6,2	58900	6,0	59500	6,0	12000	6,3
	b	3900		3770		3910		3825		3535		3570		756	
	c	58700	6,3	58600	6,2	59000	6,0	58450	6,3	58520	6,4	57960	6,0		
	d	3700		3630		3540		3680		3745		3480			
ccr - 92	a	46000	4,6	42000	4,4	38760	4,0	39000	4,2	37500	4,0	37800	4,0	8700	5,4
	b	2120		1850		1550		1640		1500		1510		465	
	c	24500	5,2	25000	5,3	24200	5,1	24750	5,0	25450	5,3	25130	5,2		
	d	1270		1325		1234		1240		1350		1310			
ccr - 93	a	55000	3,8	43600	3,2	38900	3,0	39000	3,0	39670	3,0	38600	3,1	10200	5,2
	b	2090		1400		1170		1170		1190		1200		530	
	c	49000	5,0	48700	5,2	49150	5,1	50020	5,3	49900	5,2	49760	5,2		
	d	2450		2530		2510		2650		2590		2590			
ccr - 94	a	47000	5,9	44000	5,6	41500	5,2	39600	5,0	40000	5,0	39200	5,2	9600	6,8
	b	2770		2460		2160		1980		2000		1990		650	
	c	38000	6,8	38200	6,8	37900	6,7	38000	6,8	38400	6,7	38250	6,7		
	d	2580		2000		2540		2580		2570		2560			

Tabelle 6 : Einbau markierten Leucins in ganze Zellen der ccr- Mutanten und des Wildtyps SM 11-6C während des Wachstums in Glycerin-, Glukose- oder Galaktosemedium.

Ipm : absoluter Einbau von ³H-Leucin , umgerechnet auf einen Zelltitler von 1x10⁷ Zellen/ml
a/c : Gesamtinkorporation von ³H-Leucin in Abwesenheit der Antibiotika von in Glukose-/Galaktosemedium ggwachsenen Zellen
b/d : mitochondriale Inkorporation von ³H-Leucin (Differenz zwischen dem Einbau markierten Leucins in Gegenwart von CHX und in Gegenwart von CHX und und ERY) in Hefezellen während des Wachstums in Glukose-/Galaktosemedium

belle 6) zu erkennen. Die Zugabe von Glukose bewirkt eine Stimulation des Zellwachstums und damit einen hohen Anstieg der absoluten Inkorporation durch das cytoplasmatische sowie eine geringe Zunahme durch das mitochondriale Proteinsynthesesystem. Nach 3 Stunden Wachstum (≈ 1 Zellverdopplung) der Wildtypzellen in Glukosemedium erreicht die Repression ihren maximalen Wert, eine relative Abnahme um den Faktor 6 (Abb. 16). Im weiteren Wachstum der Zellen in Glukosemedium bleibt die mitochondriale Proteinsynthese bei einem konstant niedrigen Wert von 0,8 %, die Wildtypzellen sind vollständig reprimiert.

In Galaktosemedium gezüchtete Wildtypzellen (Tabelle 6, Abb. 16) zeigen - im Gegensatz zu in Glukose gewachsenen Kulturen - eine geringere Repression der mitochondrialen Proteinsynthese. Nach einer Zellgeneration (≈ 4 Stunden) ist eine maximale Abnahme um den Faktor 2 zu beobachten.

Die Mutante ccr-91 läßt im Vergleich zum Wildtyp, eine Stunde nach Zugabe von Galaktose oder Glukose zum Wachstumsmedium, einen Anstieg des absoluten Einbaus von markiertem Leucin durch beide Proteinsynthesysteme um den Faktor 5 erkennen. Der mitochondriale Proteinsynthesanteil bleibt beim Übergang der Zellen vom dereprimierten in den reprimierten Zustand konstant hoch bei 6,3% (Tabelle 6, Abb. 16). Die Zunahme der absoluten Inkorporation von ^3H -leucin in beide Systeme ist nicht wie beim Wildtyp vorübergehend, da andauernde Repressionsbedingungen zu keiner signifikanten Abnahme der mitochondrialen Proteinsynthese führen. Demnach unterliegt die Synthese der mitochondrialen Proteine in der Mutante ccr-91 nicht der Ka-

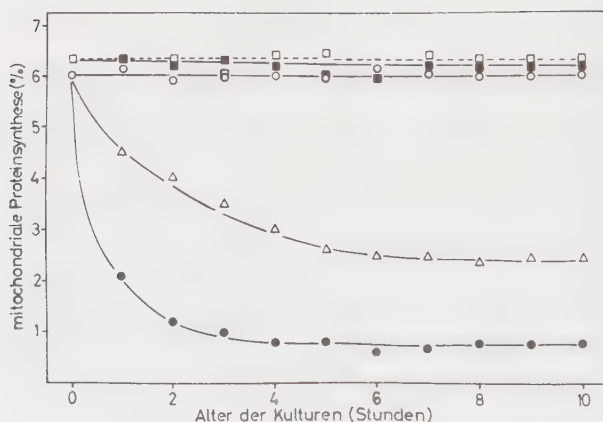


Abb. 16

Einbau von markierten Aminosäuren durch das mitochondriale Proteinsynthesystem in ganze Zellen des Wildtyps und der Mutante ccr-91.

Die Kulturen wurden bis zu einem Titer von $2-3 \times 10^7$ Zellen/ml in YNB-Medium mit 3% Glyzerin gezüchtet. Die Kulturen wurden aufgeteilt und zum Zeitpunkt 0h 7,5% Glukose oder 3% Galaktose zugesetzt. Eine Probe wuchs zur Kontrolle in Glyzerinmedium weiter. Zu verschiedenen Zeiten nach Wachstumsbeginn der Zellen in vergärbaren Substraten wurden die Zellen in Abwesenheit der Antibiotika, in Gegenwart von CHX (100 µg/ml) und in Gegenwart von CHX und ERY (4 mg/ml) 45 Minuten mit ^3H -Leucin (0,7 µCi/ml) inkubiert. Gleichzeitig wurde die Zellzahl in einem Eppendorf-Photometer bestimmt. Als mitochondriale Proteinsynthese wird der CHX-resistente, ERY-sensible Einbau von ^3H -leucin in Prozent des nicht gehemmten Einbaus in Hefezellen bezeichnet. Der errechnete mitochondriale Proteinsyntheseanteil (Tabelle 6) wird in Abhängigkeit zum Zellwachstum für den Wildtyp und für die Mutante ccr-91 aufgetragen.

Wildtyp SM 11-6C in Glyzerin-○—○, in Galaktose-△—△ und in Glukosemedium ●—●

Mutante ccr-91 in Glyzerin-□----□ und in Glukose- und Galaktosemedium ■—■

tabolitrepression.

Eine Stunde nach Zugabe von Glukose zu dereprimierten Kulturen der Mutanten ccr-92, ccr-93 und ccr-94 (Tabelle 6, Abb. 17)

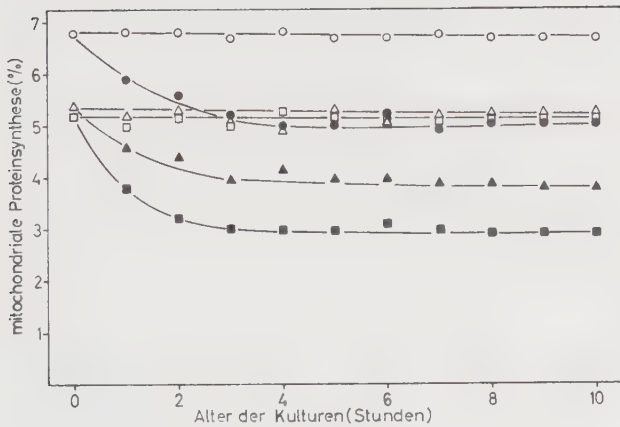


Abb. 17

Einbau von ^3H -Leucin ($0,7 \mu\text{Ci/ml}$) durch die mitochondriale Proteinsynthese in ganze Zellen der Mutanten ccr-92, ccr-93 und ccr-94.

Die Markierung wurde wie in der Legende zu Abb. 16 beschrieben durchgeführt. Der prozentuale mitochondriale Proteinsyntheseanteil an der Gesamtproteinsynthese der Hefezellen (Tabelle 6) wurde in Abhängigkeit zum Zellwachstum der ccr-Mutanten in Glyzerin-, Galaktose- und Glukosemedium aufgetragen. Der prozentuale Anteil der mitochondrialen Proteinsynthese zeigte in allen ccr-Mutanten keine Unterschiede während des Wachstums der Zellen in Glyzerin- und Galaktosemedium, daher wurden nur die Werte für das Wachstum der Zellen in Glyzerinmedium dargestellt.

Mutante ccr-92 in Glyzerin- und Galaktosemedium Δ — Δ
und in Glukosemedium $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$

Mutante ccr-93 in Glyzerin- und Galaktosemedium $\square$ — $\square$
und in Glukosemedium $\blacksquare$ — $\blacksquare$

Mutante ccr-94 in Glyzerin- und Galaktosemedium $\circ$ — $\circ$
und in Glukosemedium $\bullet$ — $\bullet$

nimmt der absolute Einbau von markiertem Leucin durch das cytoplasmatische um den Faktor 5 und durch das mitochondriale Proteinsynthesesystem um den Faktor 4,5 bis 5 zu. Der prozentuale Anteil der mitochondrialen Proteinsynthese an der Gesamtsynthese verringert sich dagegen um den Faktor 1,0 bis 1,4. Nach einer Zellverdopplung in Glukosemedium

($\approx$ 3 Stunden) wird eine Repression um den Faktor 1,5-2 beobachtet, die sehr viel geringer ist als beim Wildtyp.

Die Mutanten ccr-92, ccr-93 und ccr-94 zeigen im Gegensatz zum Wildtyp während des Wachstums in Galaktosemedium eine konstant hohe mitochondriale Proteinsynthese (Tabelle 6, Abb. 17).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die mitochondriale Proteinsynthese sofort nach Zugabe von vergärbaren Substraten zu dereprimierten Wildtypzellen stark reduziert wird. Die Repression der mitochondrialen Proteinsynthese geht allen hier untersuchten Veränderungen im mitochondrialen Bereich voran. Sie ist vermutlich als Ursache für die Reduktion der Zellatmung, der Enzymaktivitäten der Atmungskette und des Cytochromgehalts anzusehen, da die Biogenese der Atmungskette die Synthese in der mitDNS kodierter und in den Mitochondrien synthetisierter Proteine erfordert (Borst und Grivell, 1978).

Eine konstant hohe, von der Glukoserepression nicht beeinflussbare, mitochondriale Proteinsynthese führt demnach in der Mutante ccr-91 zur konstitutiven Ausprägung der mitochondrialen Funktionen wie Atmungsaktivität und Cytochromgehalt.

Die Mutanten ccr-92, ccr-93 und ccr-94 zeigen eine geringere Repression der mitochondrialen Proteinsynthese (Faktor 1,0 bis 1,4) durch Glukose im Vergleich zum Wildtyp (Faktor 6), aber keine konstant hohe Syntheseleistung wie die Mutante ccr-91. Im Gegensatz zum Wildtyp bleibt bei

diesen Mutanten, ähnlich wie bei der Mutante ccr-91, die mitochondriale Proteinsynthese konstant hoch während des Wachstums der Zellen in Galaktosemedium. Dieses Ergebnis zeigt gute Übereinstimmung mit den schon beschriebenen Untersuchungen der Atmungsaktivität, des Cytochromgehalts und den mitochondrialen Enzymsynthesen. Die konstitutive Ausprägung der mitochondrialen Syntheseleistungen ist in den Mutanten ccr-92, ccr-93 und ccr-94 - im Gegensatz zur Mutante ccr-91 - von der Art des vergärbaren Substrates im Wachstumsmedium abhängig.

8. Radioaktive Markierung der DNS beim Wildtyp und bei den ccr⁻ Mutanten

8.1. Isolierung und Bestimmung der mitDNS

Nach Inkubation der Kulturen in Galaktose-, Glukose- oder Glyzerin-Minimalmedium mit ¹⁴C- und ³H-Adenin (Abb.18) wurden die Zellen mit Hilfe der enzymatischen Methode von Kováč et al. (1972) in abgeänderter Form (Doxiadis, Diss., 1978) aufgeschlossen. Wie in Material und Methoden (vgl. Kapitel 6.10.) beschrieben, wurden die Protoplasten lysiert, mit EB versetzt und mit einer gesättigten NaJ-Lösung eine Dichte von 1,4295 eingestellt. Die Verwendung des Farbstoffes EB bewirkt eine bessere Auftrennung der DNS-Arten, da er durch Interkalation in doppelsträngige Nukleinsäure-Moleküle ihre Dichte herabsetzt. EB lagert sich bevorzugt an A+T reiche Regionen an, die in der mitDNS auftreten (Prunell und Bernadi, 1977). Der Farbstoff EB bildet unter UV-Licht einen fluoreszierenden Komplex mit der DNS und erleichtert so

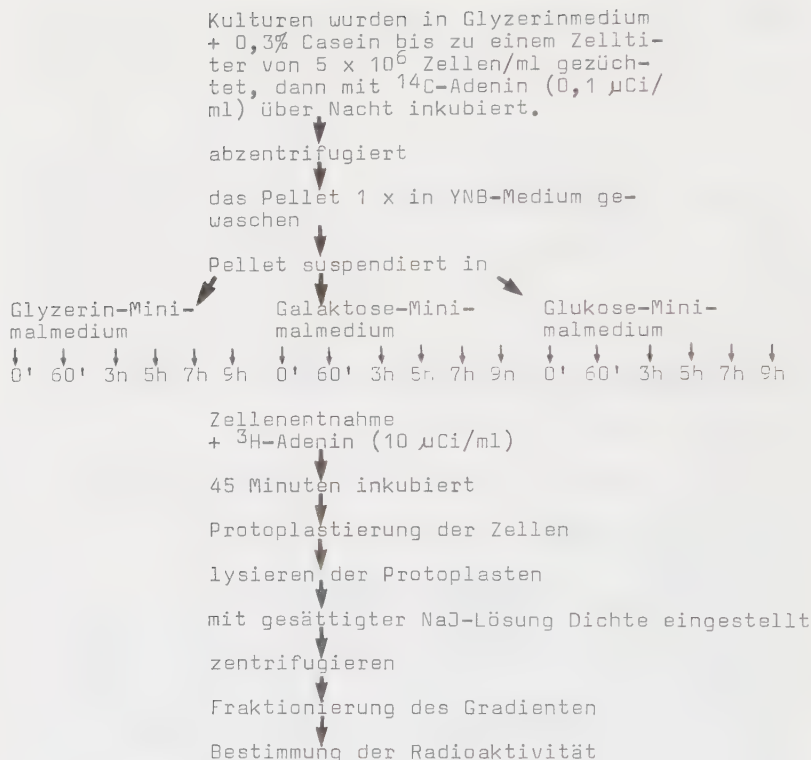


Abb. 18

Schematische Darstellung des Markierungsversuches: Bestimmung des prozentualen Anteils der mitDNS bei den ccr-Mutanten und beim Wildtyp während des Wachstums in Glukose- oder Galaktosemedium im Vergleich zu in Glycerinmedium gewachsenden Zellen.

die Erkennung der Banden nach Zentrifugation des NaJ-Gradienten (Abb.19). Nach Fraktionierung der Gradienten erfolgte die Bestimmung der Radioaktivität, ihre Verteilung im Gradienten wurde schematisch in Abb.20 aufgezeichnet. Aus dieser Darstellung geht hervor, daß zwei Maxima auftreten, das erste mit hoher Dichte stellt die nucDNS und das zweite die

mitDNS dar (Doxiadis, Diss. 1978). Das prozentuale Verhältnis der mitDNS zur totDNS wurde durch Aufzeichnung der Radioaktivitätsverteilung (Vor- und Nachmarkierung) im Gradienten, wie in Abb.20 dargestellt, bestimmt. Nach Addition aller cpm von beiden Maxima (nuc- und mitDNS) konnte der prozentuale Anteil der mitDNS berechnet werden.

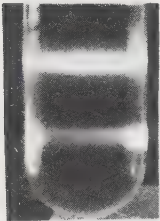


Abb.19

NaJ-Dichtegradient mit EB nach Zentrifugation der lysierten Protoplasten. Die obere Bande stellt die mitDNS und die untere Bande die nucDNS dar.

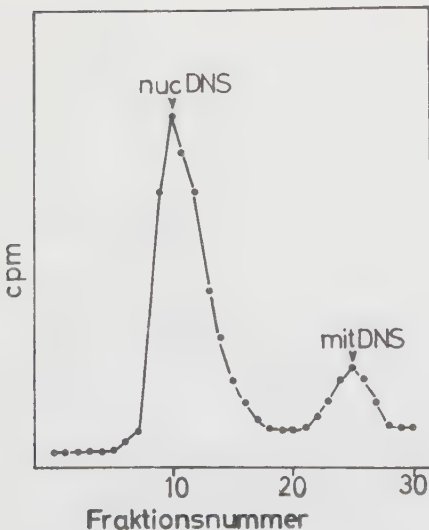


Abb.20

Schematische Darstellung der Radioaktivitätsverteilung im NaJ-Gradienten.

Das erste Maximum mit hoher Dichte stellt die nucDNS, das zweite die mitDNS dar. Durch Addition aller cpm von beiden Maxima (nuc- und mitDNS) kann der prozentuale Anteil der mitDNS bestimmt werden.

8.2. Veränderungen des prozentualen Anteils der mitDNS während der Katabolitrepression

Kulturen des Wildtyps und der ccr^- Mutanten wurden nach dem in Abb. 18 beschriebenen Versuchsschema gezüchtet und mit ^{14}C - und ^3H -Adenin behandelt. Die Radioaktivitätsverteilung (Vor- und Nachmarkierung) wurde für jeden Gradienten aufgezeichnet, hier aber nur für dereprimierte Kulturen des Wildtyps (Abb. 21a) und der Mutante $ccr-91$ (Abb. 22a) und nach Wachstum der beiden Stämme in Glukosemedium (Abb. 21b und 22b) dargestellt. Daraus konnte der prozentuale Anteil der mitDNS bei den ccr^- Mutanten und beim Wildtyp während des Wachstums in vergärbaren Substraten und in Glyzerinmedium errechnet werden (Abb. 23 und 24).

Der prozentuale Anteil der mitDNS beträgt in dereprimierten Wildtypzellen und ccr^- Mutanten zwischen 17,5% und 14% relativ zur nucDNS .

Im Gegensatz zur mitochondrialen Proteinsynthese zeigt der prozentuale Anteil der mitDNS eine Stunde nach Zugabe von vergärbaren Substraten zu dereprimierten Wildtypzellen nur eine sehr geringe Abnahme um den Faktor 1,2. Erst nach drei Zellverdopplungen (≈ 9 Stunden) ist der maximale Wert der Repression in Galaktose- um den Faktor 1,5 und in Glukosemedium um den Faktor 3 erreicht (Abb. 23). Die in Abb. 21b dargestellte Radioaktivitätsverteilung im Gradienten beim Wildtyp nach Wachstum in Glukosemedium (2 Zellverdopplungen ≈ 6 Stunden) zeigt deutlich einen Anstieg der Vormarkierung (^{14}C -Adenin) und eine Abnahme der Nachmarkierung (^3H -Adenin) in der mitDNS im Vergleich zu derepri-

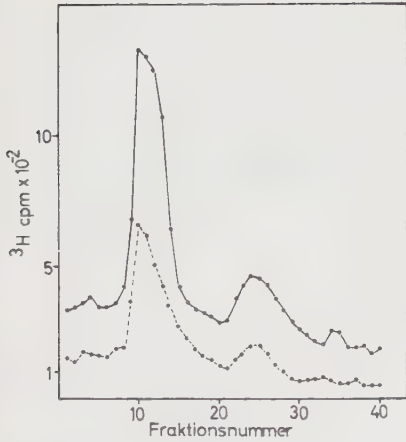


Abb. 21a

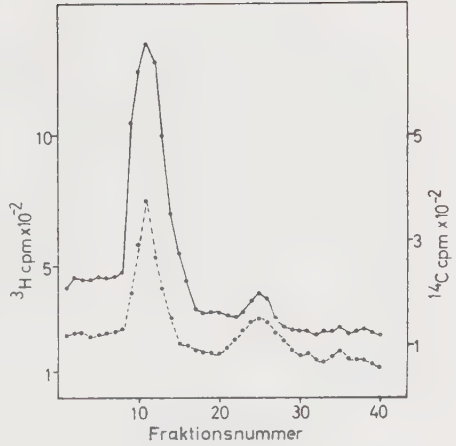


Abb. 21b

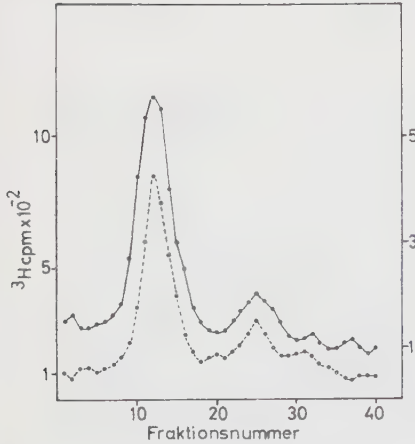


Abb. 22a

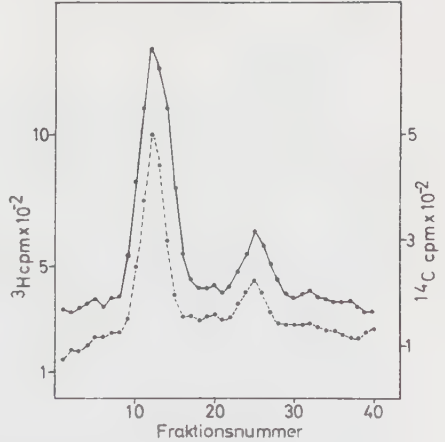


Abb. 22b

Abb. 21a,b und 22a,b

Radioaktivitätsverteilung im NaJ-Gradienten nach Zentrifugation und Fraktionierung beim Wildtyp SM 11-6C und der Mutante ccr-91. ^{14}C -Adenin $0,1 \mu\text{Ci/ml}$) ●-----●, Nachmarkierung (^3H -Adenin $10 \mu\text{Ci/ml}$) ●-----● wurde wie in der Legende zu Abb. 23 und 24 beschrieben durchgeführt.
 Abb. 21a = Wildtyp in Glycerinmedium
 Abb. 21b = Wildtyp 6 Stunden Glukosemedium
 Abb. 22a = Mutante ccr-91 in Glycerinmedium
 Abb. 22b = Mutante ccr-91 6 Stunden in Glukosemedium

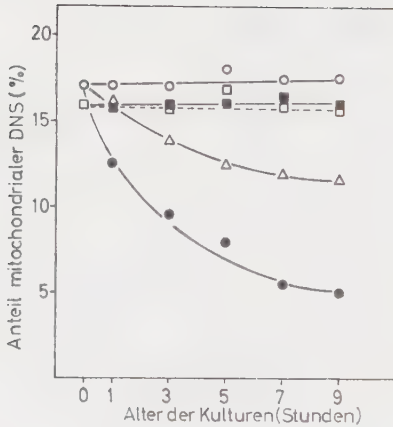


Abb. 23

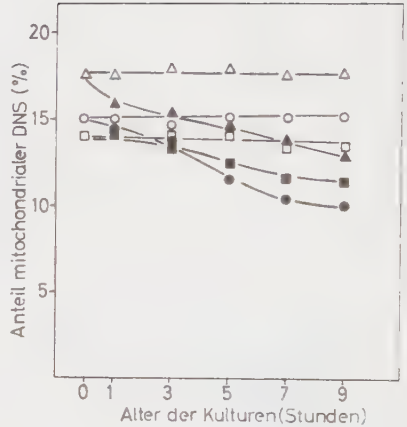


Abb. 24

Abb. 23 und 24

Prozentualer Anteil der mitDNS, der relativ zur nucDNS bestimmt wurde, beim Wildtyp SM 11-6C und den ccr-Mutanten in Abhängigkeit zum Zellwachstum:
Die Kulturen wurden in Glyzerinmedium + 0,3% Casein bis zu einem Titer von 5×10^6 Zellen/ml gezüchtet. Über Nacht wurden die Zellen bei 23°C mit ^{14}C -Adenin ($0,1 \mu\text{Ci/ml}$) inkubiert. Die Zellsuspension wurde abzentrifugiert und in YNB-Medium gewaschen. Das Pellet wurde in Glyzerin-, Galaktose- oder Glukose-Minimalmedium suspendiert. Zu bestimmten Zeiten des Zellwachstums wurden Proben entnommen und 45 min mit ^3H -Adenin ($10 \mu\text{Ci/ml}$) behandelt. Anschließend wurden die Zellen enzymatisch aufgeschlossen, die Protoplasten lysiert, mit EB versetzt und mit einer gesättigten NaJ-Lösung die Dichte eingestellt. Nach Zentrifugation des Gradienten in einer Ultrazentrifuge und Fraktionierung wurde die Radioaktivität bestimmt. Die Verteilung der Radioaktivität (Vor- und Nachmarkierung) im Gradienten wurde für jede Probe, wie schematisch in Abb. 20 dargestellt, aufgezeichnet. Daraus konnte nach Addition aller cpm von beiden Maxima (nuc- und mitDNS) der prozentuale Anteil der mitDNS berechnet werden.

Abb. 23 = Wildtyp SM 11-6C in Glyzerin-○—○, in Galaktosemedium △—△ und in Glukosemedium ●—●; Mutante ccr-91 in Glyzerin-□—□, in Glukose- und Galaktosemedium ■—■

Abb. 24 = Mutante ccr-92 in Glyzerin-○—○, in Glukose- und Galaktosemedium ●—●; Mutante ccr-93 in Glyzerin-△—△, in Glukose- und Galaktosemedium ▲—▲; Mutante ccr-94 in Glyzerin-□—□, in Glukose- und Galaktosemedium ■—■

mierten Kulturen (Abb.21a) . Vor- und Nachmarkierung der nucDNS dagegen bleibt unverändert. Im weiteren Wachstum der Kulturen in vergärbaren Substraten, d.h. nach drei Zellverdopplungen, bleibt der prozentuale Anteil der mitDNS in Galaktose bei $\approx 11\%$ und in Glukose bei $\approx 5\%$ konstant (Abb.23). Diese Ergebnis läßt gute Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Cottrell et al.(1970), Bleeg et al. (1972) und Böker et al. (1976) erkennen. Die Autoren fanden übereinstimmend, daß als Folge der Katabolitrepression die mitDNS relativ zur nucDNS in Hefezellen abnimmt.

Die Mutante ccr-91 zeigt während des Wachstums in vergärbaren Substraten im Vergleich zu dereprimierten Kulturen keine Veränderungen in der Radioaktivitätsverteilung (Vor- und Nachmarkierung) im Gradienten (Abb.22a und 22b). Der prozentuale Anteil der mitDNS bleibt konstant hoch bei 16% (Abb.23).

Bei den Mutanten ccr-92, ccr-93 und ccr-94 nimmt der prozentuale Anteil der mitDNS während des Wachstums in Glukosemedium gering, aber signifikant im Vergleich zu dereprimierten Zellen ab (Abb.24). Nach drei Zellverdopplungen (≈ 9 Stunden) zeigen diese ccr⁻ Mutanten in Glukosemedium eine Abnahme um den Faktor 1,2 bis 1,4. Die hier beobachtete Repression des prozentualen Anteils der mitDNS ist wie bei den anderen untersuchten mitochondrialen Funktionen sehr viel geringer als beim Wildtyp ausgeprägt.

Galaktose als Kohlenstoffquelle im Wachstumsmedium bedingt bei den Mutanten ccr-92, ccr-93 und ccr-94 im Vergleich zu dereprimierten Kulturen keine Verringerung des prozen-

tualen Anteils der mitDNS (Abb.24). Dieses Ergebnis zeigt Übereinstimmung mit der Atmungsaktivität, dem Cytochromgehalt und mit der mitochondrialen Proteinsynthese während des Wachstums der ccr^- Mutanten in Galaktosemedium.

Der prozentuale Anteil der mitDNS beim Wildtyp nimmt im Gegensatz zu allen anderen untersuchten mitochondrialen Funktionen während der Glukoserepression nur sehr gering ab. Die sofort nach Zugabe von Glukose auftretende starke Reduzierung der mitochondrialen Proteinsynthese (Abb.16), die Abnahme des Sauerstoffverbrauchs um den Faktor 5 (Abb.3) und der vollständige Verlust des Cytochroms aa₃ (Abb.11) weisen darauf hin, daß die sehr geringe und langsam ablaufende Repression des prozentualen Anteils der mitDNS nur als ein sekundärer Effekt der Glukose-Katabolitrepression angesehen werden kann.

Die hier beschriebenen Experimente zur Derepression/Repression bei den ccr^- Mutanten zeigen, daß nur eine der ccr^- Mutanten, die $ccr-91$, optimal dem gesuchten Mutantentyp entspricht. Sie läßt unabhängig von der Art und Konzentration der Kohlenstoffquelle im Wachstumsmedium eine konstitutive dereprimierte Ausprägung mitochondrialer Funktionen erkennen.

Die Mutanten $ccr-92$, $ccr-93$ und $ccr-94$ zeigen - im Gegensatz zum Wildtyp - eine sehr viel geringere Repression in allen untersuchten mitochondrialen Funktionen, sie können aber nicht als in mitochondrialen Funktionen konstitutiv dereprimierte Mutanten wie die Mutante $ccr-91$ bezeichnet werden. Diese ccr^- Mutanten sind in ihrem konstitutiv dereprimier-

ten Verhalten abhängig von der Art des vergärbaren Substrates im Wachstumsmedium. Sie lassen den ccr^- Phänotyp nur während des Wachstums in Galaktosemedium erkennen.

D I S K U S S I O N

Der Ausgangspunkt der Untersuchungen war die Frage nach dem Vorgang der Steuerung der Glukose-Katabolitrepression in der Hefe Saccharomyces cerevisiae. Einige Arbeitsgruppen konnten zeigen, daß das Wachstum in vergärbaren Substraten eine pleiotrope Verringerung der Aktivität vieler Funktionen in den Mitochondrien bedingt (Jayaraman et al., 1966; Bleeg et al., 1972; Perlman und Mahler, 1974). Die Befunde zeigen Übereinstimmung mit der Annahme, daß eine Repression mitochondrialer Genexpression als Ursache dafür anzusehen ist. Diese Hypothese fordert ein System der genetischen Steuerung und läßt erwarten, daß durch Mutation konstitutive Repression oder Derepression erzielt werden kann.

In der vorliegenden Arbeit ist nun versucht worden, mit einem geeigneten Selektionssystem Mutanten zu isolieren, deren mitochondriale Funktionen dereprimiert sind. Lokalisation und Bestimmung der Dominanz der ccr^- Mutation(en), Untersuchungen zur Repression und Derepression cytoplasmatischer und mitochondrialer Funktionen der ccr^- Mutanten im Vergleich zum Wildtyp sollten Einblick in den Vorgang der Steuerung der Katabolitrepression verschaffen.

1. Isolierung von konstitutiv dereprimierten Mutanten

Das Ziel, ccr^- Mutanten zu isolieren, konnte mit der TTC-Färbemethode erreicht werden. Sie bietet eine schnelle Möglichkeit nach Behandlung des Wildtyps mit dem Mutagen NG, zwischen atmungsdefekten, reprimierten (weißen) und

atmungskompetenten, dereprimierten (roten) Kolonien während des Wachstums in Glukosemedium zu unterscheiden. Diese roten Kolonien können aber nur vorläufig als "Glukose-resistente" Mutanten bezeichnet werden. Erst Isolate aus Einzelkolonien, die eine eindeutig gleiche Rotfärbung auf Glukose- und Glyzerinplatten zeigen, werden als konstitutiv dereprimierte (ccr^-) Mutanten abisoliert. Mit dieser Selektionsmethode werden zwei Gruppen von ccr^- Mutanten erfaßt:

- a) ccr^- Mutanten, die in der Verwertung von Glukose stark eingeschränkt sind.
- b) Die gesuchten ccr^- Mutanten, deren mitochondriale Funktionen konstitutiv dereprimiert sind.

Der erst genannte Mutantentyp kann durch Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeit in Glukosemedium ausgeschlossen werden, da er viel langsamer als der Wildtyp wächst.

Die TTC-Färbemethode wird wegen ihrer Einfachkeit in der Durchführung zur Isolierung der ccr^- Mutanten angewendet. Die Rotfärbung von Kolonien reicht aber nicht als einziges Kriterium aus, um selektiv in mitochondrialen Funktionen dereprimierte Mutanten zu erkennen.

2. Lokalisierung der ccr^- Mutation(en)

Die genetischen Untersuchungen wurden sehr erschwert durch das Auftreten von nicht eindeutiger Färbung der Sporen und den relativ häufigen 3 : 1 (ccr^- : ccr^+) Sporenverhältnissen in der Teträdenanalyse. Auch die diploiden Nachkommen aus der Kontrollkreuzung $ccr^+ \times ccr^+$ zeigten nicht

nur weiße Kolonien nach TTC-Behandlung sondern auch mehr oder weniger rote Kolonien. Diese Ergebnisse weisen auf verschiedene, die TTC-Färbung modifizierende Faktoren hin, die in den Sporen neu kombiniert oder rekombiniert worden sind und Abweichungen vom ccr^- bzw. ccr^+ Phänotyp verursachen. Erst nach Verwendung von weitgehend isogenischen Stämmen, d.h. ccr^- Sporen wurden mehrmals mit dem Elternstamm zurückgekreuzt, konnte ein klares 2 : 2 Sporenverhältnis in den Tetraden nach TTC-Überschichtung beobachtet werden. Der Vererbungsmodus der ccr^- Mutation(en) in allen vier hier untersuchten Mutanten entspricht einem karyotischen Erbgang und ist dominant.

Die Analyse der Rekombinantenhäufigkeit in Kreuzungen von $ccr^- \times ccr^-$ Mutanten untereinander ergab keine Rekombinanten des ccr^+ Phänotyps. Daraus kann geschlossen werden, daß alle vier ccr^- Mutationen in eng gekoppelten Genen liegen oder allel sind, wie es auch Ciriacy (1977) bei anderen ccr^- Mutanten beobachten konnte. Der hier gezeigte Vererbungsmodus für die ccr^- Mutationen kann als Hinweis auf eine genetische Steuerung der Glukose-Katabolitrepression angesehen werden.

3. Repression und Derepression beim Wildtyp

Der Wildtyp SM.11-6C zeigt in allen untersuchten cytoplasmatischen und mitochondrialen Funktionen eine durch Glukose stark ausgeprägte Repression. Dieses Ergebnis läßt eine gute Übereinstimmung mit Beobachtungen mehrerer Arbeitsgruppen an anderen Hefe-Wildtypstämmen erkennen:

1. Eine verzögerte, starke Abnahme der Atmungsaktivität (Jayaraman et al., 1966; Beck und von Meyenburg, 1968; Böker et al., 1976) und der damit verbundene, sofortige Anstieg der CO_2 -Produktion (Ciriacy, 1977) konnte nach Zugabe von Glukose beobachtet werden.
2. Das von Jayaraman et al. (1966) und Bleeg et al. (1972) beschriebene vollständige Fehlen des Cytochroms aa₃- und eine Abnahme im Gehalt der anderen Cytochrome tritt während der Glukoserepression auf.
3. Aktivitäten der cytoplasmatischen Enzyme Maltase und Malatsynthase (Duntze et al., 1969; Zimmermann und Eaton, 1974) und der mitochondrialen Enzyme MDH und SDH werden durch Glukose reduziert (Polakis und Bartley, 1965; Witt et al., 1966).
4. Die stark ausgeprägte Verringerung der mitochondrialen Proteinsynthese (Henson et al., 1968; Schweyen, 1971; Ibrahim et al., 1973) geht allen anderen Veränderungen im mitochondrialen Bereich während des Wachstums der Zellen in Glukosemedium voran (Böker et al., 1976).
5. Die Abnahme des mitDNS-Gehalts relativ zur nuDNS (Bleeg et al., 1972) zeigt gute Übereinstimmung mit der Verringerung in der Anzahl der mitDNS-Moleküle (Stevens, 1974; Williamson, 1976) unter reprimierenden Wachstumsbedingungen.
6. Andere vergärbare Substrate wie Galaktose verursachen eine geringere Katabolitrepression im cytoplasmatischen und mitochondrialen System (Beck und von Meyenburg, 1968; Polakis und Bartley, 1964).

Die gut ausgeprägte Glukose-Katabolitrepression läßt erkennen, daß der Wildtyp SM 11-6C gut zur Isolierung von ccr^- Mutanten und zum Studium der Repression und Derepression geeignet ist.

4. Aussagen über den Vorgang der Katabolitrepression in ccr^- Mutanten

Das generelle, regulatorische Phänomen Katabolitrepression bei der Hefe Saccharomyces cerevisiae kann zusammenfassend folgendermaßen charakterisiert werden:

- a) Vergärbare Substrate als Kohlenstoffquelle im Wachstumsmedium verursachen eine Repression bzw. Inaktivierung einer Reihe cytoplasmatischer und mitochondrialer Enzymsynthesen.
- b) Die vollständige strukturelle und funktionellen Entwicklung der Mitochondrien wird beeinflußt.

Katabolitrepression beeinflußt in der Hefe gleichmäßig Funktionen des cytoplasmatischen und mitochondrialen Bereichs, wobei nicht bekannt ist, auf welcher Stufe die Regulation einsetzt. Alle bisherigen Untersuchungen gehen von der Annahme aus, daß die Steuerung der Katabolitrepression in der Hefe sich ähnlich wie im Bakteriensystem verhält. Bei *E.coli* entwickelten Pastan und Perlman (1970) und Pastan und Adhya (1976) ein Modell für die Wirkung des cAMP am "lac-operon" als einen vorstellbaren Mechanismus der Glukoserepression:

"Induktoren stimulieren die mRNS-Synthese durch Bindung des Repressors und dabei wird seine Affinität zum Operator herabgesetzt. cAMP stimuliert die Synthese dadurch, daß es einen Komplex mit dem cAMP-Rezeptorprotein (CRP) bildet,

der sich an die DNS bindet (Pastan und Adhya, 1976) und ermöglicht so der RNS-Polymerase die Transkription des Operons".

Ähnlich wie bei Bakterien (E.coli) wird auch bei der Hefe der cAMP-Gehalt in der Zelle durch Wachstum in Glukose-medium reduziert. Zugabe von cAMP zum Medium bewirkt eine Aufhebung der Repression verschiedener Syntheseleistungen in E.coli (Ullmann und Monod, 1968) und in Hefen (Fang und Butow, 1970; Mahler und Lin, 1978). Bisher konnte jedoch nicht geklärt werden, ob cAMP entscheidend an der Regulation der Katabolitrepression in Hefen beteiligt ist wie in Bakterien auf dem Niveau der Transkription (Silverstone et al., 1969).

Seit langem wird versucht, durch Mutanten ein Modell für die Steuerung der Katabolitrepression in der Hefezelle aufzustellen. Die bisher isolierten Mutanten waren dazu nicht geeignet, da sie nur ein verändertes Verhalten in der Repression eines Enzymsystems zeigten, andere Aktivitäten aber die gleiche Repression wie der Wildtyp erkennen ließen.

Die Untersuchungen zur Repression/Derepression beim Wildtyp ergaben, daß die sofort nach Zugabe von Glukose sehr stark abnehmende mitochondriale Proteinsynthese als Ursache für die Repression der anderen mitochondrialen Funktionen angesehen werden kann, da die Biogenese der Atmungskette die Synthese in der mitDNS kodierter und in Mitochondrien synthetisierter Proteine erfordert. Die geringe und langsam ablaufende Repression der mitDNS dagegen ist nur ein sekundärer Effekt der Glukose-Katabolit-

repression. Chandrasekaran und Jayaraman (1978) bestätigen die Annahme, daß Glukose primär während der Biogenese der Mitochondrien eine Repression der mitochondrial synthetisierten Produkte verursacht. Mit einer genauen Analyse der Cytochrom-c-Oxidase konnten sie durch Glukose eine direkte Hemmung der mitochondrial synthetisierten Unterheiten, unabhängig von den Kern kodierten, nachweisen. Die Ergebnisse der hier beschriebenen Experimente bei dem Wildtyp veranlaßten die Isolierung von ccr^- Mutanten, deren mitochondriale Funktionen konstitutiv dereprimiert sind. Vier Mutanten wurden charakterisiert, aber nur die Mutante $ccr-91$ entsprach optimal dem gesuchten Mutantentyp. Sie zeigte unabhängig von der Art und Konzentration der Kohlenstoffquelle im Wachstumsmedium ausschließlich eine konstitutiv dereprimierte Ausprägung von Syntheseleistungen im mitochondrialen Bereich. Dieser Befund weist auf eine durch die ccr^- Mutation(en) verursachte Abtrennung des mitochondrialen Funktionsbereiches vom Prozeß der Glukose-Katabolitrepression, der unverändert im cytoplasmatischen System abläuft, hin. Diese Annahme kann durch folgende Ergebnisse, die unter andauernden Repressionsbedingungen bei den ccr^- Mutanten beobachtet wurden, belegt werden:

- a) Die CO_2 -Produktion nimmt sofort nach Zugabe von Glukose wie beim Wildtyp zu und erreicht das gleiche Niveau. Das weist auf eine unveränderte Aktivität und Stimulierbarkeit des gesamten glykolytischen Abbaus hin.
- b) Keine Reduzierung der Wachstumsgeschwindigkeit im Ver-

gleich zum Wildtyp. Bei der Mutante *ccr-91* ist sogar eine erhöhte Wachstumsgeschwindigkeit zu beobachten, die Mobilisierung von Zucker ist nicht eingeschränkt.

c) Die Repression der cytoplasmatischen Enzymaktivitäten läuft unverändert wie beim Wildtyp ab.

d) Aktivitäten von Enzymen der Atmungskette, der Cytochromgehalt, der Sauerstoffverbrauch und die mitochondriale Proteinsynthese bleiben im Vergleich zum Wildtyp konstant hoch.

e) Der prozentuale Anteil der mitDNS und die Anzahl der fluoreszierenden, cytoplasmatischen Strukturen ($\hat{=}$ mitDNS-Moleküle), die mit Hilfe der DAPI-Fluoreszenzmethode bestimmt wurden, lassen keine Veränderungen erkennen.

Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß die konstant hohe, durch Katabolitrepression nicht beeinflussbare mitochondriale Proteinsynthese als Ursache für die konstitutive Ausprägung mitochondrialer Funktionen in den *ccr*⁻ Mutanten angesehen werden kann. Im cytoplasmatischen, glykolytischen Funktionsbereich dagegen läuft die Repression bei den *ccr*⁻ Mutanten ähnlich wie beim Wildtyp ab. Der Defekt einer einzelnen mitochondrialen Funktion kann ausgeschlossen werden, da die *ccr*⁻ Mutationen dominant sind und konstitutive Funktionen bewirken.

Die bisherigen Befunde bei den *ccr*⁻ Mutanten können den Regulationsmechanismus der Katabolitrepression nicht eindeutig klären. Sie weisen aber sehr auf die Richtigkeit der Hypothese hin, daß die mitochondriale Proteinsynthese

als Endglied der Expression mitochondrialer Gene wahrscheinlich nicht mehr der Repression eines (hypothetischen) "Glukose-Kataboliten" unterliegt. Ein Induktor oder Repressor der mitochondrialen Genexpression, der beim Wildtyp durch einen "Kataboliten" inaktiviert wird, erlangt durch die ccr^- Mutation(en) konstitutive Funktionen und bedingt in den ccr^- Mutanten die Ausprägung der mitochondrialen Syntheseleistungen während der Katabolitrepression. Einen direkten Beweis für eine Regulation der Glukoserepression auf dem Niveau der mitochondrialen Genexpression kann nur durch das Studium der Transkription an mitDNS erbracht werden.

Im Bereich der Kern-kodierten mitochondrialen Proteine wurden bereits ähnliche Untersuchungen von Zitomer und Nichols (1978) durchgeführt. Die Autoren konnten beim Glukose-sensiblen Cytochrom c zeigen, daß während der Glukoserepression eine Genregulation auf dem Niveau der Transkription stattfindet.

5. Vergleich mit anderen ccr^- Mutanten

Die von Ciriacy (1977, 1978) beschriebene ccr^- Mutante, die einem einzelnen Kern-Gen CCR 80 zugeordnet werden konnte, wurde aus einem ADH⁻ Stamm isoliert. Sie läßt wie die Mutante $ccr-91$ eine konstitutiv dereprimierte Ausprägung mitochondrialer Funktionen wie Atmung und Enzyme der Atmungskette erkennen. Auch hier konnte als Ursache dafür ein Defekt einer mitochondrialen Funktion ausgeschlossen werden, da die ccr^- Mutation dominant ist und konstitutive Funktionen bewirkt. Der pleio-

trope Effekt dieser Mutation auf die Expression Glukose-sensibler Funktionen im mitochondrialen Bereich und die unverändert ablaufende Repression im cytoplasmatischen Bereich wird von Ciriacy als ein Hinweis auf eine regulatorische Funktion des Gens CCR 80 in der Glukoserepression angesehen. Im Gegensatz zur Mutante ccr-91 zeigt die Mutante CCR-80^r eine Verringerung in der CO₂-Produktion nach Zugabe von Glukose sowohl unter aeroben wie anaeroben Bedingungen. Die Glykolyse läuft demnach unter Katabolitreppressionsbedingungen nicht normal ab, d. h. wie beim Wildtyp. Es wird angenommen, daß durch den primären regulatorischen Defekt, der nicht geklärt werden konnte, die Hexose Aufnahme oder Verwertung gestört wird und die Folge davon eine mehr oder weniger konstitutive Ausprägung der Glukose-sensitiven Funktionen im mitochondrialen Bereich ist.

Untersuchungen an GIS-Mutanten (Mutanten mit einer spontanen Sporulation in 10% Glukosemedium, Hartwig, Diss. 1979), die von M. Breitenbach zur Verfügung gestellt wurden, zeigten für die Mutante GIS-26 einen ähnlichen ccr⁻ Phänotyp wie die Mutante ccr-91. Atmungsaktivität und Cytochromgehalt ließen keine Veränderungen im Vergleich zu dereprimierten Kulturen erkennen, d.h. mitochondriale Funktionen waren während der Repression vollständig ausgeprägt. Diese Mutante konnte bisher nicht genauer charakterisiert werden, da die Analyse der Tetraden keine klaren ccr⁻ : ccr⁺ Sporenverhältnisse zeigten.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß durch die bisher

wenigen, untersuchten ccr^- Mutanten ($ccr-91$, $CCR-80^T$ und GIS-26) zwar der Regulationsmechanismus der Glukoserepression auf dem Niveau der mitochondrialen Genexpression eingegrenzt werden konnte, aber die Art der Steuerung der Repression in der Hefe konnte damit nicht geklärt werden. Daher wurde mit der hier beschriebenen TTC-Färbemethode weitere ccr^- Mutanten mit dem Phänotyp der $ccr-91$ Mutante isoliert und charakterisiert. Durch gelelektrophoretische Auftrennung von mitRNS des reprimierten Wildtyps im Vergleich zum dereprimierten konnten Änderungen im Bandenmuster beobachtet werden. Von 9 mitochondrialen Transkripten, die beim dereprimierten Wildtyp erkennbar waren, konnte ein vollständiges Fehlen von drei Banden nach Wachstum der Zellen in Glukosemedium beobachtet werden. Bei einer der untersuchten ccr^- Mutanten konnte das Auftreten mindestens einer der drei "Glukose-sensitiven" Banden gezeigt werden (Francisci-Culasso, pers. Mitteilung). Dieses Ergebnis weist auf die Existenz einer Regulation der Katabolitrepression auf dem Niveau der Transkription hin. Der Befund wird durch Untersuchungen von Baldacci et al. (1977, 1979) an verschiedenen isoakzeptierenden tRNS-Spezies, die in ihrem Auftreten abhängig sind vom Repressionszustand der Hefezelle, bestätigt.

6. Ausblick

Bisher sind nur quantitative Untersuchungen zur Gesamtsyntheserate an mitochondrialen Proteinen der ccr^- Mutanten durchgeführt worden. Eine Aufschlüsselung der Syntheserate einzelner Proteine durch Pulsmarkierung, gelektrophoretische

Auftrennung mitochondrialer Proteine , Quantifizierung der Synthese durch Densitometrierung der Autoradiogramme könnten geeignet sein, unterschiedliche Repression der Expression mitochondrialer Gene aufzuzeigen, wie es als Effekt der Anaerobiose für die Cytochrom-c-Oxidase von Woodrow und Schatz (1979) gezeigt werden konnte. Derartige Untersuchungen wurden schon von Kaplan und Criddle (1970) durchgeführt, allerdings konnte damals mit den wenig auflösenden gelelektrophoretischen Techniken kein befriedigendes Ergebnis erbracht werden. Eine erneute Analyse erscheint daher angebracht, vor allem, da bei positiven Ergebnissen ein Kriterium auf molekularem Niveau zur weiteren Charakterisierung der ccr^- Mutanten bereitstehen würde.

Die Isolierung einer Serie von ccr^- Mutanten, die in verschiedener Weise eine Störung oder Veränderung einer genetischen Steuerung zeigen, sind von großer Bedeutung für den Erfolg der Untersuchungen zur Katabolitrepresion:

- a) Eine Klasse von Mutanten, die super - reprimierten, können relativ leicht durch TTC-Färbetechnik erkannt werden, da die Aktivitäten mitochondrialer Funktionen bei Zugabe von vergärbaren Substraten wesentlich stärker reduziert werden als beim Wildtyp. Atmungsdefekte Mutanten, die ebenfalls keine TTC-Färbung zeigen, können an ihrer permanenten Unfähigkeit auf Glyzerin oder Äthanol zu wachsen, erkannt und eliminiert werden.
- b) Behandlung eines gut Glukose reprimierbaren Wildtyps mit dem Mutagen Manganchlorid zur Isolierung von ccr^- Mutanten,

die eine extrakaryotische Vererbung zeigen. Mit Hilfe der rho⁻ Deletionskartierung kann eindeutig geklärt werden, ob die ccr⁻ Mutation auf der mitDNS liegt und wo sie kartiert. Das Auffinden eines (oder mehrerer) CCR-Gene ist von großer Bedeutung zur Klärung der Frage nach der Art des Regulationssystems der Katabolitrepression.

c) Mutanten mit Resistenzen gegen Glukose analoge Substrate (Glucosamin, 2-Desoxyglukose) sind von großer Bedeutung zur Aufklärung einer möglichen Korrelation zwischen Glukose- und Glucosaminrepression. Seit langem ist bekannt, daß Glucosamin eine ähnliche Repression in der Hefezelle verursacht wie Glukose. Dieser Befund konnte hier auch für den Wildtyp SM 11-6C gezeigt werden. Die ccr⁻ Mutanten dagegen ließen ein "Glucosamin-resistentes" Verhalten erkennen. Sie waren aber nicht zu weiteren Untersuchungen geeignet, da die Tetradenanalyse der diploiden Nachkommen aus der Kreuzung Wildtyp x ccr⁻ Mutanten kein klares Verhältnis für Glucosamin-resistente : Glucosamin-sensible Sporen zeigten.

Erst durch experimentelle Analysen einer Serie von Mutanten und die Möglichkeit der Kombination verschiedener Allele, deren Dominanz/Rezessivität bestimmt wird, kann die Art des Regulationsmechanismus der Katabolitrepression und daran beteiligten Gene in der nuc- und mitDNS studiert werden.

Z U S A M M E N F A S S U N G

Das regulatorische Phänomen Katabolitrepression bei der Hefe Saccharomyces cerevisiae wurde an vier konstitutiv dereprimierten (ccr^-) Mutanten, die mit Hilfe der TTC-Färbetechnik isoliert werden konnten, im Vergleich zum Wildtyp untersucht. Die genetischen und biochemischen Analysen führten zu folgenden Ergebnissen:

Die ccr^- Mutation zeigt in allen vier Mutanten ($ccr-91$, $ccr-92$, $ccr-93$, $ccr-94$) einen karyotischen Erbgang und ist dominant. Die vier Mutationen sind entweder allel oder liegen in eng gekoppelten Genen, sie sind aber nicht iso-allel.

Unabhängig von der Art und Konzentration der Kohlenstoffquelle zeigt nur die Mutante $ccr-91$ konstitutiv dereprimierte Funktionen im mitochondrialen Bereich. Die anderen Mutanten ($ccr-92$, $ccr-93$, $ccr-94$) lassen während der Glukose-repression im Vergleich zum Wildtyp eine sehr geringe, aber im Gegensatz zur Mutante $ccr-91$ eine signifikante Reduzierung in allen untersuchten mitochondrialen Syntheseleistungen erkennen. Bei diesen Mutanten bedingt die ccr^- Mutation nur eine völlige "Resistenz" gegen die reprimierende Wirkung der Galaktose im mitochondrialen Funktionsbereich.

Alle vier ccr^- Mutanten zeigen im Gegensatz zum Wildtyp eine "Resistenz" gegen das Glukose analoge Substrat Glucosamin.

Als Ursache für die Veränderung der Katabolitrepression kann eine eingeschränkte Verwertung von vergärbaren Sub-

straten (Glukose oder Galaktose) ausgeschlossen werden, da die ccr^- Mutanten eine schnellere oder gleiche Wachstumsgeschwindigkeit wie der Wildtyp zeigen.

Die beim Wildtyp beobachtete Repression der mitochondrialen Proteinsynthese geht den anderen untersuchten Veränderungen im mitochondrialen Bereich voran. Sie ist verantwortlich für die Abnahme der Zellatmung, der Enzymaktivitäten der Atmungskette und des Cytochromgehalts. Die im Vergleich zur Proteinsynthese sehr langsam ablaufende Repression des mitDNS-Gehalts ist nur ein sekundärer Effekt der Katabolit-repression.

Eine konstant hohe, von der Katabolit-repression nicht oder nur wenig beeinflussbare mitochondriale Proteinsynthese ist demnach als Ursache für die konstitutive Ausprägung mitochondrialer Funktionen in den ccr^- Mutanten anzusehen. Der Defekt nur einer mitochondrialen Funktion als Ursache dafür ist ausgeschlossen, da die ccr^- Mutationen dominant sind und konstitutive Funktionen bewirken.

Die im wesentlichen unveränderte Aktivität und Stimulierbarkeit der Glykolyse und Gluconeogenese beweisen, daß die Repression im cytoplasmatischen Funktionsbereich bei den ccr^- Mutanten ähnlich wie beim Wildtyp abläuft. Die Begrenzung der Katabolit-repression auf das cytoplasmatische System, d.h. konstitutiv dereprimierte Funktionen im mitochondrialen Bereich, weist auf eine genetische Steuerung der Repression auf dem Niveau mitochondrialer Genexpression hin. Die Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß mit hoher Wahrscheinlichkeit die mitochondriale Proteinsynthese als

Endglied der Expression mitochondrialer Gene in den hier untersuchten cor^- Mutanten nicht mehr der Repression durch einen "Glukose/Galaktose-Kataboliten" unterliegt.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- Arrigoni, O., TH.P. Singer: Limitations of the phenazine methosulfate assay for succinic and related dehydrogenases. *Nature* 193, 1256 - 1265 (1962)
- Atzpodien, W., J.M. Gancedo, W. Duntze, H. Holzer: Isoenzymes of malate dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur.J.Biochem.* 7, 58 - 62 (1968)
- Bachhofen, V., R.J. Schweyen, K. Wolf, F. Kaudewitz: Quantitative selection of respiratory deficient mutants in yeast by TTC. *Z. Naturforsch.* 27b, 252 - 256 (1972)
- Baldacci, G., C. Falcone, L. Frontali, G. Macino, C. Palleschi: Differences in mitochondrial isoaccepting tRNAs from *Saccharomyces cerevisiae* as a function of growth conditions. In: *Mitochondria 1977: Genetics and Biogenesis of Mitochondria* (Bandlow, W., R.J. Schweyen, K. Wolf, F. Kaudewitz, eds). Berlin: De Gruyter, 571 - 574 (1977)
- Baldacci, G., C. Falcone, S. Francisci, L. Frontali, C. Palleschi: Mitochondrial protein-synthesizing machinery in *Saccharomyces cerevisiae* grown in different metabolic conditions. *Eur.J.Biochem.* 98, 181 - 186 (1969)
- Beck, Ch., H.K. von Meyenburg: Enzyme pattern and aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae* under various degrees of glucose limitation. *J. of Bact.* 96, 479 - 486 (1968)
- Bleeg, H.S., A.L. Bak, C. Christiansen, K.E. Smith, A. Stenderup: Mitochondrial DNA and glucose repression in yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 47, 524 - 530 (1972)
- Böker, E., F. Kaudewitz, K.V. Richmond, R.J. Schweyen, D.Y. Thomas: The effect of glucose on the number of mitochondrial genomes participating in mitochondrial crosses. In: *Genetics, Biogenesis and Bioenergetics of Mitochondria* (Bandlow, W., R.J. Schweyen, D.Y. Thomas, K. Wolf, F. Kaudewitz, eds.). Berlin: De Gruyter, 99 - 115 (1976)
- Borst, P., L.A. Grivell: The mitochondrial genome of yeast. *Cell* 15, 705 - 723 (1978)
- Chandrasekaran, K., J. Jayaraman: Effect of cyclic AMP on the biogenesis of cytochrome oxidase in Yeast. *FEBS Lett.* 87, 52 - 54 (1978)
- Chapman, C., W. Bartley: The kinetics of enzyme changes in yeast under conditions that cause the loss of mitochondria. *Biochem J.* 107, 455 - 465 (1968)

- Cheung, W.Y.: Adenosine 3',5'-phosphate and oscillations of DPNH in a cell-free extract of *Saccharomyces carlsbergensis*. *Biochim. Biophys. Acta* 115, 235 - 239 (1966)
- Ciriacy, M. : Genetics of alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. I. Isolation and genetic analysis of adh mutants. *Mutation Research* 29, 315 - 326 (1975b)
- Ciriacy, M. : Cis-dominant regulatory mutations affecting the formation of glucose-repressible alcohol dehydrogenase (ADH II) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molec. gen. Genet.* 145, 327 - 333 (1976)
- Ciriacy, M. : Isolation and preliminary characterisation of yeast mutants affected in carbon catabolite repression. In: *Mitochondria 1977: Genetics and Biogenesis of Mitochondria* (Bandlow, W. , R.J. Schweyen, K. Wolf, F. Kaudewitz, eds.). Berlin: De Gruyter, 543 - 549 (1977)
- Ciriacy, M. : A yeast mutant with glucose-resistant formation of mitochondrial enzymes. *Molec. gen. Genet.* 159 329 - 335 (1978)
- Clark, J.B. , A.L. Greenbaum, T.F. Slater: Effects of tetrazolium salts on oxidative phosphorylation in rat-liver mitochondria. *Biochem. J.* 94, 651 - 654 (1965)
- Cottrell, S.F. , Ch. J. Avers: Evidence of mitochondrial synchrony in synchrony cell cultures of yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 38, 973 - 980 (1970)
- De Deken, R.H. : The crabtree effect: A regulatory system in yeast. *J. gen. Microbiol.* 44, 149 - 156 (1966)
- Dixon, G.H. , H.L. Kornberg: Assay methods for key enzymes of the glyoxylate cycle. *Biochem. J.* 3P. (1959)
- Doxiadis, I. : Charakterisierung der mitochondrialen DNS aus *Saccharomyces cerevisiae* : RHO⁻ Bildung in temperatursensiblen Mutanten. Dissertation München (1978)
- Duntze, W. , D. Neumann, J.M. Gancedo, W. Atzpodien, H. Holzer: Studies on the regulation and localization of the glyoxylate cycle enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 10, 83 - 89 (1969)
- Elliot, J.J. , A.J.S. Ball: Glucosamin-resistant mutants. *Genetics* 74, S.71 (1973)
- Elliot, J.J. , A.J.S. Ball: A new mitochondrial mutation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 64, 277 - 281 (1975)
- Entian, K-D. , F.K. Zimmermann, I. Scheel: A partial defect in carbon catabolite repression in mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with reduced hexose phosphorylation. *Molec. gen. Genet.* 156, 99 - 105 (1977)

- Estabrook, R.W. : Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP : O ratio. In: Methods of Enzymology (Colowick, S.P. , N.O. Kaplan, eds.). New York : Academic Press Bd., 10, 41 - 47 (1967)
- Fang, M. , R.A. Butow: Nucleotide reversal of mitochondrial repression in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 41, 1579 - 1583 (1970)
- Ferguson, J.J. , M. Boll , H. Holzer: Yeast malate dehydrogenase: Enzyme inactivation in catabolite repression. Eur. J. Biochem. 1 , 21 - 25 (1967)
- Furst, A. , C.A. Michels: An evaluation of D-glucosamine as a gratuitous catabolite repressor of *Saccharomyces carlsbergensis*. Molec. gen. Genet. 155, 309 - 314 (1977)
- Gancedo, C. : Inactivation of fructose-1,6 diphosphatase by glucose in yeast. J. of Bact. 107, 401 - 405 (1971)
- Hartwig, H. : Beiträge zur biochemischen Kontrolle der Sporulation der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation Wien (1979)
- Henson, C.P. , C.N. Weber, H.R. Mahler: Formation of yeast mitochondria. I. Kinetics of amino acid incorporation during derepression. Biochemistry 7, 4431 - 4444 (1968)
- Holzer, H. : Catabolite inactivation in yeast. Trends. Biochem. Sci. 1 , 178 - 180 (1976)
- Ibrahim, N.G. , R.N. Stuchell , D.S. Beatti: Formation of yeast mitochondrial membran. II. Effects of glucose repression on mitochondrial protein synthesis. Eur. J. Biochem. 36, 519 - 527 (1973)
- Jayaraman, J. , C. Cotman, H.R. Mahler, C.W. Sharp : Biochemical correlates of respiratory deficiency. VII. Glucose repression. Archives Biochem. Biophys. 116, 224 - 251 (1966)
- Kaplan, D. , R.S. Criddle: A comparison of insoluble mitochondrial membrane proteins from glucose repressed and derepressed *Saccharomyces carlsbergensis*. Biochim. Biophys. Acta 203 , 249 - 255 (1970)
- Kováč, L. , G.S.P. Groot, E. Racker: Translocation of protons and potassium ions across the mitochondrial membrane of respiring and respiration-deficient yeast. Biochim. Biophys. Acta 256, 55 - 65 (1972)
- Kutzleb, R. , R.J. Schweyen, F. Kaudewitz: Extrachromosomal inheritance of paromomycin resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. Molec. gen. Genet. 125, 91 - 98 (1973)

- Lamb, A.J. , G.D. Clark-Walker, A.W. Linnane: The biogenesis of mitochondria. IV. The differentiation of mitochondrial and cytoplasmic protein synthesizing systems by antibiotics. *J. Biol. Chem.* 233 , 657 - 663 (1968)
- Loury, O.H. , N.J. Rosenbrough, A.L. Farr, R.J. Randall: Protein measure with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265 - 275 (1951)
- Magasanik, B. : Catabolite repression. Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol. 26, 249 - 262 (1961)
- Mahler, H.R. , C.C. Lin: Exogenous adenosine 3':5'-monophosphate can release yeast from catabolite repression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 83, 1039 - 1047 (1978)
- Makman, R.S., E.W. Sutherland: Adenosine 3',5'-phosphate in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 240, 1309 - 1314 (1965)
- Montenecourt, B.S. , S.C. Kuo, J.O. Lampen: *Saccharomyces* mutants with invertase formation resistant to repression by hexoses. *J. of Bact.* 114, 233 - 238 (1973)
- Nachlas, M.M. , St.J. Margulies, A.M. Seligman: Sites of electron transfer to tetrazolium salts in the succinoxidase system. *J. Biol. Chem.* 235 , 2739 - 2743 (1960)
- Neal, W.K., H.P. Hoffmann, C.A. Price: *Plant Cell Physiol.* 12, 181 - 192 (1971)
- Ochoa, S.: In : *Methods in Enzymology I* (Colowick, S.P., N.O. Kaplan, eds.). New York: Academic Press, Bd. 1, 735 - 739 (1955)
- Ogur, M. , R.St. John, S. Nagai : Tetrazolium overlay technique for population studies of respiration deficiency in yeast. *Science* 125, 982 - 929 (1957)
- Pastan, I. , R. Perlman : Cyclic adenosine monophosphate in Bacteria. *Science* 169, 339 - 344 (1970)
- Pastan, I., S. Adhya: Cyclic adenosine 5' monophosphate in *Escherichia coli*. *Bacteriological Reviews* 40, 527 - 551 (1976)
- Perlman, P.S., H.R. Mahler: Derepression of mitochondria and their enzymes in yeast: Regulatory aspects. *Archives Biochem. Biophys.* 162, 248 - 271 (1974)
- Polakis, E.S., W. Bartley, G.A. Meek: Changes in the structure and enzyme activities of *Saccharomyces cerevisiae* in response to changes in the environment. *Biochem. J.* 90, 369 - 374 (1964)

- Polakis, E.S. , W. Bartley: Changes in the enzyme activities of *Saccharomyces cerevisiae* during aerobic growth on different carbon sources. *Biochem. J.* 97, 284 - 297 (1965)
- Polakis, E.S., W. Bartley, G.A. Meek: Changes in the activities of respiratory enzymes during the aerobic growth of yeast on different carbon sources. *Biochem. J.* 97, 298 - 302 (1965)
- Prunell, A. , G. Bernadi: The mitochondrial genome of wild-type yeast cells. *J. Mol. Biol.* 110, 53 - 74 (1977)
- Raut, C. : A cytochrome deficient mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Exptl. Cell Res.* 4, 295 - 305 (1953)
- Rytka, J. , A. Sledziewski, J. Litwinska, T. Bilinski: Haemoprotein formation in yeast. II. Isolation of catalase regulatory mutants. *Molec. gen. Genet.* 145, 37 - 42 (1976)
- Schamhart, D.H.J., A.M. ten Berge, K.W. van de Poll: Isolation of catabolite repression mutant of yeast as a revertant of a strain that is maltose negative in the respiratory-deficient state. *J. of Bact.* 121, 747 - 752 (1975)
- Schweyen, R.J. : Genetische und biochemische Untersuchungen zur mitochondrialen Proteinsynthese an der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation München (1971)
- Schweyen, R.J. , F. Kaudewitz : Differentiation between mitochondrial and cytoplasmic protein synthesis in vivo by use of a temperature-sensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 44, 1351-1355 (1971)
- Schweyen, R.J., U. Steyrer, F. Kaudewitz: Mapping of mitochondrial genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molec. gen. Genet.* 146, 117 - 132 (1976)
- Siegel, M.R. , H.D. Sisler: Cycloheximide and other glutarimide antibiotics. In: *Antibiotics, mechanism of action* (Gottlieb, D. , P.D. Shaw, eds.). Berlin: Springer Verlag (1967)
- Silverstone, A.E., B. Magasanik, W.S. Reznikoff, J.H. Miller, J.R. Beckwith: Catabolite sensitive site of the lac operon. *Nature* 221, 1012 - 1014 (1969)
- Slater, T.F., B. Sawyer, U. Sträuli: Studies on succinate-tetrazolium reductase system. III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. *Biochim. Biophys. Acta* 77 , 383 - 393 (1963)
- Sols, A., C. Gancedo, G. dela Fuente: Energy-yielding metabolism in yeast. In: *The Yeast* (Rose, A.H., J.G. Harrison, eds.). London: Academic Press, Bd 2, 271 - 307 (1971)

- South, D.J., H.R. Mahler: RNA synthesis in yeast mitochondria: A derepressible activity. *Nature* 218, 1226 - 1232 (1968)
- Stevens, B.J.: Variation in mitochondrial numbers and volume in yeast according to growth conditions. *J. Cell Biol.* 63, 336A (1974)
- Sy, J., D. Richter : Content of cyclic 3',5'-adenosine monophosphate and adenylyl cyclase in yeast at various growth conditions. *Biochemistry* 11, 2788 - 2791 (1972)
- Ullmann, A., J. Monod: Cyclic AMP as an antagonist of catabolite repression in *Escherichia coli*. *FEBS Letters* 1, 57 - 60 (1968)
- van Wijk, R., T.M. Konijn: Cyclic 3',5'-AMP in *Saccharomyces carlsbergensis* under various conditions of catabolite repression. *FEBS Letters* 13, 184 - 186 (1971)
- Williamson, D.H., D.J. Fennell: The use of fluorescent DNA-binding agent for detecting and separating yeast mitochondrial DNA. In : *Methods in Cell Biology* (Prescott, D.M.) New York: Academic Press, Bd. 12, 335 - 351 (1975)
- Williamson, D.H. : Packing and recombination of mitochondrial DNA in vegetatively growing cells. In: *Genetics, Biogenesis and Bioenergetics of Mitochondria* (Bandlow, W., R.J. Schweyen, D.Y. Thomas, K. Wolf, F. Kaudewitz, eds.). Berlin: De Gruyter, 117 - 123 (1976)
- Witt, I., R. Kronau, H. Holzer: Repression von Alkoholdehydrogenase, Malatdehydrogenase, Isocitratlyase und Malatsynthase in Hefe durch Glukose. *Biochim. Biophys. Acta* 118, 522 - 537 (1966)
- Wolf, K., B. Dujon, P.P. Slonimski: Multifactorial crosses involving a mutation conferring paromomycin-resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molec. gen. Genet.* 125, 53 - 90 (1973)
- Woodrow, G., G. Schatz : The role of oxygen in the biosynthesis of cytochrome c oxidase of yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* 254, 6088 - 6093 (1979)
- Zimmermann, F.K., N.R. Eaton: Genetics of induction and catabolite repression of maltase synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molec. gen. Genet.* 134, 261 - 272 (1974)
- Zimmermann, F.K., I. Scheel: Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* resistant to carbon catabolite repression. *Molec. gen. Genet.* 154, 75 - 82 (1977)
- Zitomer, R.S., D.L. Nichols: Kinetics of glucose repression of yeast cytochrome c. *J. of Bact.* 135, 39 - 44 (1978)

Am Ende dieser Arbeit möchte ich allen Mitarbeitern des Instituts herzlich danken, die zu ihrer Entstehung beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt :

Herrn Priv.Do. Dr.R.J.Schweyen für die Bereitstellung des Themas, Beratung, stete Diskussionsbereitschaft und Interesse an den Versuchsergebnissen.

Herrn Dr.I.Doxiadis für die Einführung in die Methode der radioaktiven Markierung der Hefe-DNS, für wertvolle Hinweise und zahlreiche Diskussionen.

Herrn G.Rüdel für Anregungen und Diskussionsbereitschaft.

Herrn Dr.M.von Ciriacy (Darmstadt) für die Messungen am Warburg-Apparat und seinen zahlreichen Diskussionen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Bereitstellung von Geldmitteln.

LEBENS LAUF

- | | |
|-------------|---|
| 1947 | geboren in Berlin am 23. Mai |
| 1953 - 1959 | Volksschule in Berlin |
| 1959 - 1961 | Besuch des Gabriele von Bülow Gymnasiums in Berlin |
| 1961 - 1967 | Besuch des naturwissenschaftlichen Zweiges des Lily-Braun Gymnasiums in Berlin |
| 1967 | Abitur |
| 1967 - 1968 | Krankenpflegeausbildung in Berlin und München |
| 1968 - 1973 | Studium der Biologie an der Universität München |
| 1973 - 1975 | Diplomarbeit am Genetischen Institut der Universität München |
| 1975 | Beginn der Dissertationsarbeit am Genetischen Institut der Universität München unter der Anleitung von Priv. Doz. Dr. R.J. Schweyen |
| 1977 | Eheschließung mit Dr. Franz Schmitt |

